



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



**LIZ OLIVEIRA DOS SANTOS**

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE UM NOVO MATERIAL DE  
REFERÊNCIA DE FARINHA DE MILHO**

**Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Pinto dos Santos**

**Coorientador: Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos**

**SALVADOR – BAHIA**

**Novembro / 2016**

LIZ OLIVEIRA DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE UM NOVO MATERIAL DE  
REFERÊNCIA DE FARINHA DE MILHO**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do título de Doutora em Química, área de concentração Química Analítica.**

**Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Pinto dos Santos**

**Coorientador: Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos**

**SALVADOR – BAHIA**

**Novembro / 2016**

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA para ser confeccionada pelo autor

dos Santos, Liz Oliveira  
Desenvolvimento e aplicação de um novo material de referência de farinha de milho / Liz Oliveira dos Santos. -- Salvador, 2016.  
118 f. : il

Orientadora: Ana Maria Pinto dos Santos.  
Coorientador: Valfredo Azevedo Lemos.  
Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Química)  
-- Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, 2016.

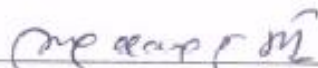
1. Material de Referência. 2. ANOVA. 3. PCA. 4. HCA.  
5. Elipse de confiança. I. dos Santos, Ana Maria Pinto.  
II. Lemos, Valfredo Azevedo. III. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO


LIZ OLIVEIRA DOS SANTOS


“DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE UM NOVO MATERIAL DE REFERÊNCIA DE FARINHA DE MILHO”

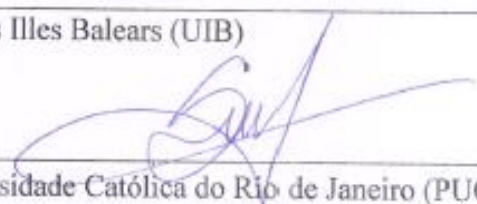
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof.ª Dr.ª Ana Maria Pinto dos Santos   
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)  
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos   
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)  
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos   
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)  
Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Víctor Cerdà Martín   
Doutorado em Química, Universitat de les Illes Balears (UIB)  
Universitat de les Illes Balears

Prof. Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira   
Doutorado em Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio)  
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva   
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)  
Universidade Estadual de Santa Cruz

Salvador, 27 de outubro de 2016.

Dedico esse trabalho a minha família, meus amigos e a todos os professores que contribuíram para minha formação.

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, por sempre ter me guiado e por ter me dado à oportunidade de realizar os meus projetos e sonhos. Por me ajudar a compreender que todas as coisas têm seu tempo determinado para acontecer. E entender que a paciência é a palavra de ordem.

A Professora Ana Maria Pinto dos Santos, pela orientação, amizade, dedicação e confiança. Por ser sempre essa pessoa amiga, que conquista a todos a sua volta.

Ao Professor Sérgio Luis Costa Ferreira, pelos conselhos e acolhimento. Por saber conduzir de forma brilhante o GRPQQ. Sinto-me feliz em conquistar essa amizade.

Ao Professor Valfredo Azevedo Lemos, pelo incentivo, amizade e apoio de sempre. Por motivar e ser exemplo aos seus alunos.

Aos membros da banca Prof. Victor Cerdà, Erik Paranhos e Walter Nei pelas colaborações.

A toda minha família, principalmente meus pais, que sempre estão me incentivando para os estudos e me apoiando nos momentos mais difíceis.

Ao meu namorado Raphael, pelo carinho, incentivo, paciência e por saber compreender minha ausência.

A Geovane C. Brandão por todas as contribuições no trabalho e por compartilhar comigo suas ideias e alegrias.

As amigas: Fernanda, Ivanice, Luana, Ariane e Vanessa pelos bons momentos de descontração vividos. Tenho certeza que bons frutos virão de dessa amizade, que levarei para toda a vida.

Aos amigos Jorge, Gabriel por ter estado ao meu lado durante anos, me incentivando e apoiando.

Aos amigos do GRPQ: Augusto, Uenderson, Cheilane, Caio, Gabrielle, Buga, Queila, Dominique, Débora, Adriana, Pró Neyla, Ariana, Gabriela, Geysa, Nuno, Geizi, Daniel Levi, Shirlei, Luise, Mário e Jucelino. A presença, carinho e momentos de descontração foram fundamentais para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos alunos da Professora Ana: Emmanuelle, Lorena, Celeste, Jorge e Abraão. Por compartilhar as ideias e amizade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química da UFBA, pela contribuição durante as disciplinas ministradas e por fazerem parte da minha história acadêmica.

Aos amigos Geisiane, Dudu, Luciano, Valdinei e Robson. Pela amizade e bons momentos vividos juntos.

Marina Rodrigues do SENAI pelos auxílios e boas dicas.

Fernando Mota da LabWin pelas elaborações da elipses de confiança.

Os laboratórios colaboradores pela disponibilidade e grande contribuição no meu trabalho.

À Universidade Federal da Bahia por proporcionar a continuidade dos meus estudos. Aos professores, amigos e funcionários. Muito obrigada.

Ao CAPES pela bolsa concedida.

A todos que torceram e contribuíram pela realização deste trabalho.

*"Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes "*

*(Isaac Newton)*



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Guia das etapas de caracterização do material de referência. ....	30
Figura 2. Representação gráfica do método de z-scores.....	43
Figura 3. Modelo representativo de uma elipse de confiança. ....	45
Figura 4. Indicação dos tipos de erros possíveis no gráfico da elipse de confiança. ....	45
Figura 5. Gráfico de pesos A) e Gráficos de Scores B) das duas primeiras componentes principais (PC1 x PC2) para estudo da massa mínima do candidato a material de referência de farinha de milho. ....	65
Figura 6. Gráficos pesos A) e Scores B) de PC1 xPC2 para o teste de homogeneidade intra recipientes utilizando uma massa de amostra de 400 mg. ....	67
Figura 7. Gráficos pesos A) e Scores B) de PC1 xPC2 para o teste de homogeneidade inter recipientes utilizando uma massa de amostra de 400 mg. ....	68
Figura 8. Dendograma do estudo de estabilidade pelo método de Ward's do candidato a MRL. ....	71
Figura 9. Elipse de confiança com base em z-escores para frações de massa dos elementos A) Ca, B) K, C) Mg, D) P, E) Cu, F) Fe, G) Mn, H) Zn. As elipses incluem os intervalos de confiança de 95% e 99%; os números de identificação dos participantes.....	75
Figura 10. Espectro de absorvância integrada na vizinhança da linha secundária de ferro em 217,812 nm para uma amostra de farinha de milho: A) sinal bidimensional e B) sinal tridimensional .....	88
Figura 11. Efeito das temperaturas de pirólise e atomização na determinação direta e simultânea de cobre e de ferro por SS-HR-CS GF AAS para uma amostra de farinha de milho.....	89
Figura 12. Curvas de regressão para teste de estabilidade do candidato a material de referência. A) Ca, B) K, C) Mg, D) P, E) Cu, F) Fe, G) Mn, H) Zn.....	112

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistema de detecção utilizado na caracterização em candidatos a MR de alimentos.....	23
Tabela 2. Resultados obtidos para o material de referência certificado de farinha de arroz SRM 1568a ( $n = 3$ ).....	63
Tabela 3. Resultados da ANOVA para o estudo de homogeneidade entre frascos para 100, 200, 300, 400 e 500 mg de amostra.....	64
Tabela 4. Resultados da ANOVA para teste de homogeneidade intrer frascos utilizando uma massa de amostra de 400 mg. ....	66
Tabela 5. Incerteza padrão devido à falta de homogeneidade decorrente de testes intra e entre frascos para todos os elementos quantificados. ....	69
Tabela 6. Resultados do estudo de estabilidade após estocagem entre 0 e 15 meses. ....	70
Tabela 7. Métodos de decomposição e técnicas instrumentais analíticas utilizadas pelos participantes da comparação interlaboratorial para candidato a material de referência de farinha de milho. ....	72
Tabela 8. Avaliação estatística dos laboratórios que fizeram as determinações dos analitos.....	73
Tabela 9. Incerteza padrão decorrente da caracterização do candidato a MR. ....	77
Tabela 10. Valores atribuídos aos elementos determinados no Material de Referência de Laboratório de Farinha de Milho. ....	77
Tabela 11. Programa de temperatura para a determinação simultânea de Cu e Fe por análise direta de sólidos e HR-CS GF AAS.....	85
Tabela 12. Figuras de mérito obtidos utilizando padrões de calibração sólidos e aquosos para a determinação direta e simultânea de Cu e Fe por SS-HR-CS GF AAS.....	90
Tabela 13. Resultados obtidos na determinação simultânea de Cu e Fe em material de Referência Certificado por SS HR-CSGFAAS.....	91

Tabela 14. Resultados da determinação direta e simultânea de ferro e cobre em amostras de farinha por SS-HR-CS GF AAS (n =3, a nível de confiança de 95%)...	92
Tabela 15. Comparação entre os métodos e outros propuseram método relatado na literatura para a determinação simultânea de Cu e Fe.....	94
Tabela 16. Concentrações de Ca, K, Mg, P, Cu, Fe, Mn e Zn nas amostras do candidato a MR farinha de milho nas massas estudadas, após procedimento de decomposição de amostras e análise por ICP OES (média ± desvio padrão, n = 3). .....	108
Tabela 17. Concentrações de Ca, K, Mg, P, Cu, Fe, Mn e Zn nas amostras do candidato a MR farinha de milho do estudo de homogeneidade intra frascos, após procedimento de decomposição de amostras e análise por ICP OES (média ± desvio padrão, n = 3).....	109
Tabela 18. Concentrações de Ca, K, Mg, P, Cu, Fe, Mn e Zn nas amostras do candidato a MR farinha de milho do estudo de homogeneidade inter frascos, após procedimento de decomposição de amostras e análise por ICP OES (média ± desvio padrão, n = 3).....	110
Tabela 19. Resultados fornecidos pelo laboratórios colaboradores. ....	99

## **ABREVIATURAS E SIGLAS**

ANOVA – Análise de Variância, do inglês, *Analysis of Variance*

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – Associação Oficial de Química Analítica, do inglês, *The Association of Analytical Chemistry*

HCA – Análise por Agrupamento Hierárquico, do inglês, *Hierarchical Cluster Analysis*

ICP OES - Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas

IRMM – Instituto para Materiais de Referência e Medições

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LRM – Laboratório de Referências Metrológicas

MR - Material de Referência

MRC – Material de Referência Certificado

MRL - Material de Referência de Laboratório

NAA - Análise de Ativação de Nêutrons, do inglês, *Neutron Activation Analysis*

NFNAP – Programa Nacional de Alimentação e Análise de Nutrientes Continuado

NIST – Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia dos Estados Unidos, do inglês *National Institute of Standards and Technology*

PCA – Análise por componentes Principais, do inglês, *principal component analysis*

USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, do inglês *United States Department of Agriculture*

XRF: Fluorescência de Raios-X, do inglês *X-Ray Fluorescence*

## Resumo

O presente trabalho foi realizado no âmbito do Projeto Desenvolvimento e produção de um candidato a material de referência: uma necessidade para o controle de qualidade de alimentos, financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq. No desenvolvimento de novos métodos analíticos uma etapa fundamental é a etapa de validação, para isso o material de referência é requisito para confirmar a exatidão do método e controle de qualidade de produtos. Este trabalho descreve o preparo, caracterização e a aplicação de um novo material de referência de laboratório. Estudos de Homogeneidade, estabilidade foram realizados para Cálcio, Potássio, Magnésio, Fósforo, Cobre, Ferro, Manganês e Zinco, aplicando as técnicas de análise por agrupamento hierárquico (HCA) e análise de componentes principais (PCA) como método alternativo aos recomendados pela ISO Guia 35:2006. A aplicação do PCA e HCA permitiu uma avaliação simples dos dados gerados. A caracterização do material foi realizada por meio de análise interlaboratorial, onde 13 laboratórios voluntários contribuíram na realização das análises. A técnica de elipse de confiança foi aplicada para avaliação dos resultados conforme recomenda a ISO 13528:2015. Foi possível caracterizar o teor de 8 componentes da farinha de milho: Ca ( $24,6 \pm 1,5 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), K ( $1307 \pm 10 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), Mg ( $184,2 \pm 1,7 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), P ( $527,1 \pm 11,1 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), Cu ( $0,61 \pm 0,24 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), Fe ( $6,31 \pm 0,49 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), Mn ( $0,91 \pm 0,1 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) e Zn ( $4,93 \pm 0,17 \text{ mg Kg}^{-1}$ ). A fim de aplicar o novo material de referência de farinha de milho um método para determinação de Cu e Fe por análise direta de sólidos e linhas secundárias do espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua foi desenvolvido, onde as temperaturas de pirólise e atomização foram otimizadas. O novo método foi validado e a exatidão confirmada pelo novo material de referência proposto. O método mostrou-se sensível e preciso quando utilizada a amostragem direta de sólidos. Desta forma é possível concluir que o material de referência de farinha de milho desenvolvido é adequado para o objetivo proposto.

**Palavras chave:** Material de Referência, Farinha de milho, ANOVA, PCA, HCA e elipse de confiança.

## Abstract

This study was conducted under the Project Development and production of a reference material candidate: a need for quality control of food, funded by the National Council for Scientific and Technological Development - CNPq. The development of new analytical methods is a fundamental step is the validation study, for this reference material is requirement to confirm the accuracy of the method and control product quality. This work describes the preparation, characterization and application of a new laboratory reference material. Studies Uniformity, stability were carried out for calcium, potassium, magnesium, phosphorus, copper, iron, manganese and zinc, by applying analytical techniques for hierarchical clustering (HCA) and principal component analysis (PCA) as an alternative method to recommended by ISO guide 35: 2006. The application of PCA and HCA allowed a simple evaluation of the data generated. The characterization of material was performed by interlaboratory analysis where 13 volunteers laboratories contributed in analysis. The confidence ellipse technique was applied to evaluate the results as recommended by ISO 13528: 2015. It was possible to characterize the content of 8 parts of corn flour: Ca ( $24.6 \pm 1.5 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), K ( $1307 \pm 10 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), Mg ( $184.2 \pm 1.7 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) P ( $527.1 \pm 11.1 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), Cu ( $0.61 \pm 0.24 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), Fe ( $6.31 \pm 0.49 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), Mn ( $0.91 \pm 0.1 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) and Zn ( $4.93 \pm 0.17 \text{ mg Kg}^{-1}$ ). In order to apply the new maize flour reference material a method for determining Cu and Fe for direct analysis of solid and secondary lines of the atomic absorption spectrometer of high resolution continuum source was developed, where temperatures pyrolysis and atomization were optimized. The new method was validated and the accuracy confirmed for proposed new reference material. The method was sensitive and precise when working with direct sampling of solids. Thus it can be concluded that maize flour reference material developed is suitable for the proposed objective.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>ABREVIATURA E SIGLAS.....</b>	<b>X</b>
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>18</b>
<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>18</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1 A importância da utilização de materiais de referência certificado (MRC) .....	19
1.2 Farinha de milho como fonte de nutrientes .....	21
1.3 Proposta de preparo e caracterização de um material de referência de farinha de laboratório de milho.....	22
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>25</b>
<b>PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO MATERIAL DE REFERÊNCIA DE LABORATÓRIO DE FARINHA DE MILHO .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Panorama sobre a produção de materiais de referência.....</b>	<b>26</b>
2.1.1 Preparo do material de referência de farinha de milho .....	28
2.1.2 Caracterização do material de referência de farinha de milho .....	29
2.1.3 Processo de esterilização com radiação gama .....	30
2.1.4 Caracterização granulométrica .....	31
<b>2.2 Caracterização dos elementos de interesse .....</b>	<b>33</b>
2.2.1 O estudo da homogeneidade .....	33
2.2.1.1 Incerteza associada à homogeneidade .....	37
2.2.2 O Estudo de Estabilidade.....	37
2.2.2.1 Incerteza associada à estabilidade.....	39
2.2.3 Caracterização: o programa interlaboratorial .....	39
2.2.3.1 Testes realizados para verificar valores dispersos .....	40
2.2.3.2 Z-Score robusto.....	42
2.2.4 Elipse de Confiança .....	43
<b>2.3 A incerteza do candidato a material de referência .....</b>	<b>46</b>

2.3.1 A análise exploratória de dados como forma alternativa a Análise de Variância .....	46
2.3.1.1 Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA) .....	48
2.3.1.2 Análise de Componentes Principais (PCA) .....	50
<b>2.4 Objetivos .....</b>	<b>53</b>
2.4.1 Objetivo geral .....	53
2.4.2 Objetivos específicos .....	53
<b>2.5 Parte experimental .....</b>	<b>54</b>
2.5.1 Instrumentação .....	54
2.5.2 Reagentes e soluções .....	54
2.5.3 Preparo do candidato a material de referência .....	55
2.5.4 Procedimento para decomposição da farinha de milho e determinação dos elementos .....	55
2.5.5 Avaliação da exatidão .....	56
2.5.6 Estudo de homogeneidade .....	56
<b>2.6 Análise estatística .....</b>	<b>57</b>
2.6.1 Avaliação da homogeneidade de acordo com a ISO Guia 35:2006.....	57
2.6.2 Avaliação da homogeneidade de acordo com a PCA .....	57
<b>2.7 Estudo de estabilidade .....</b>	<b>58</b>
2.7.1 Avaliação da homogeneidade de acordo com HCA.....	59
<b>2.8 Estudo Interlaboratorial .....</b>	<b>59</b>
2.8.1 Elipse de confiança .....	60
<b>2.9 Incerteza combinada .....</b>	<b>60</b>
<b>2.10 Discussão e resultados .....</b>	<b>61</b>
2.10.1 Validação do método analítico usado para a quantificação dos elementos	61
2.10.1.1 Sensibilidade .....	61
2.10.1.2 Precisão.....	62
2.10.1.3 Exatidão.....	62
2.10.2 Estudo de homogeneidade .....	63
2.10.2.1 Estudo da massa mínima para o candidato a Material de Referência...	63
2.10.2.2 Estudo da Homogeneidade .....	66
2.10.2.3 Incertezas inerentes à homogeneidade.....	69



2.10.3	Estudo de estabilidade.....	70
2.10.4	Caracterização do material .....	72
2.10.4.1	Incerteza associada à caracterização do material .....	77
2.10.5	Incerteza combinada.....	77
<b>2.11</b>	<b>Conclusões parciais.....</b>	<b>78</b>
<b>CAPÍTULO III.....</b>		<b>79</b>
<b>3.1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>83</b>
3.2.1	Objetivo geral.....	83
3.2.2	Objetivos específicos .....	83
<b>3.3</b>	<b>Parte experimental .....</b>	<b>84</b>
3.3.1	Equipamentos e acessórios .....	84
3.3.2	Reagentes e soluções .....	85
3.3.3	Amostras reais e material de referência certificado .....	86
<b>3.4</b>	<b>Resultados e discussão.....</b>	<b>87</b>
3.4.1	Otimização das temperaturas de Pirólise e Atomização .....	88
3.4.2	Figuras e mérito e calibração.....	90
3.4.3	Análise de amostras reais.....	92
3.4.4	Comparação com métodos da literatura .....	93
<b>3.5</b>	<b>Conclusões parciais.....</b>	<b>95</b>
<b>CAPÍTULO IIII.....</b>		<b>96</b>
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>97</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>108</b>

---

---

## **CAPÍTULO I**

### **FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

---

---

## **1 Introdução**

### **1.1 A importância da utilização de materiais de referência certificado (MRC)**

A importância e a ampla aplicação de materiais de referência certificado MRC vêm se intensificando à medida que os processos analíticos exigem cada vez mais controle e exatidão de seus resultados [1].

Os MRC são utilizados nos laboratórios para o controle das análises químicas, na calibração de equipamentos, no acompanhamento e na avaliação de analistas, no controle e atribuição de valores tidos como verdadeiros e no desenvolvimento de metodologias analíticas, requisito necessário em qualquer processo metrológico, pois permite que sejam obtidas medições confiáveis [2].

O MRC segundo definição da (Organização Internacional de Padronização.) ISO GUIA 30[3], definido como um material ou substância com uma ou mais propriedades bem determinadas, por procedimentos estabelecidos e que vem acompanhado por um certificado cujas propriedades apresentam uma incerteza para um nível de confiança associado.

A diferença existente entre material de referência certificado (MRC) e os materiais de referência de laboratório (MRL) é que o MCR vem acompanhado por um certificado que foi desenvolvido através de um procedimento que estabeleceu sua rastreabilidade, na obtenção exata da unidade na qual os valores da propriedade são expressos, com cada valor certificado acompanhado por uma incerteza para um nível de confiança requerido, mas ambos apresentam um ou mais valores de propriedades que são homogêneos e bem estabelecidos [4].

Não existem MRC para todas as matrizes dos métodos analíticos propostos atualmente em laboratórios. Só estão disponíveis materiais de referência para os métodos analíticos mais rotineiramente empregados e para um número pequeno de matrizes. Estes MRC em geral possuem um preço elevado, visto que as etapas de certificação são demoradas e dispendiosas. Poucos são produzidos no Brasil e em sua maioria são fornecidos pelo Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia dos

Estados Unidos da América (NIST) [5].

Na validação de métodos analíticos desenvolvidos para a determinação de espécies inorgânicas, a vantagem da aplicação do MRC consiste na possibilidade do usuário possuir meios de avaliar a exatidão do seu método de determinação proposto e estabelecer a rastreabilidade metrológica para seus resultados, isto é possível devido à similaridade existente da matriz destes tipos de materiais com o material a ser submetido ao processo de análise química [6]. Esta avaliação da exatidão ocorre com o MRC analisado como forma de amostra desconhecida, o resultado obtido é comparado com o valor certificado. Se um intervalo de confiança anormal for observado, o laboratório precisará identificar sua causa e corrigi-lo [7].

Outra forma de utilização dos MRL e MRC são nas curvas de calibração analíticas, porque os instrumentos de medição podem ser sensíveis a efeito de matriz. Então os procedimentos de preparo da curva de calibração empregados deverão levar em consideração tais efeitos, com isto, o método preferível de preparo da curva seria a utilização de MRC apropriados, mas tem que satisfazer dois tipos de condições necessárias [1]:

- 1) A propriedade certificada seja conhecida com confiabilidade;
- 2) A matriz do MR seja similar a das amostras analisadas e que as diferenças existentes não sejam responsáveis por gerar diferença entre o valor esperado dos resultados da análise e o valor de referência aceito nos resultados, incompatível com a incerteza requerida para a calibração.

Na segunda metade da década de 80, começaram a surgir na literatura grande número de publicações referentes à determinação de elementos químicos realizada em matrizes de alimentos e bebidas. Muitos elementos essenciais para a vida humana e aqueles de interesse toxicológico, que ocorrem nestes materiais em níveis de traço necessitam de métodos analíticos de alta sensibilidade para determinações confiáveis. A maior parte destas técnicas requer disponibilidade de materiais de referência bem caracterizados, de natureza similar às amostras para confirmar a exatidão, tornando clara a necessidade do desenvolvimento de novos

tipos de materiais, considerando o objetivo de avaliar a exatidão do método analítico e estabelecer a melhoria das análises químicas, realizando medidas de compatibilidade interlaboratorial (programa de garantia de qualidade/controle de qualidade), além de contribuir para o desenvolvimento de novos métodos de análises [8]. As condições para que MRC sejam utilizados em estudos dessa natureza são: representatividade da amostra, estabilidade com respeito aos analitos e à matriz e a homogeneidade.

Além destas condições, particularmente desafiadoras para produção e certificação de MRL, precauções importantes deverão ser tomadas também durante a coleta, técnica de processamento e estocagem para prevenir, ou até mesmo minimizar a contaminação e variações de concentrações. Como consequência disto, a produção do MRL pode ser considerado um bom substituto aos MRC, visto que muitos deles não são adequados no controle de qualidade das análises de rotina devido a algumas razões, tais como: (1) falta de valores certificados de muitos elementos importantes a serem determinados; (2) elementos certificados em concentrações muito altas comparadas com amostras reais; (3) a maioria dos MRC disponíveis comercialmente é cara para estudos em larga escala.

## **1.2 Farinha de milho como fonte de nutrientes**

O milho (*Zea mays L.*) é um dos cereais mais consumidas no mundo, sendo o segundo mais cultivado no Brasil. É composto por amido, minerais, carotenoides, açúcares, entre outros. É um alimento muito nutritivo para humanos e animais [9].

Os subprodutos do milho são os mais variados tais como fubá, canjica, óleo, amido e farinha de milho [9]. Na forma de farinha é muito utilizada na culinária brasileira de várias maneiras, como na preparação de bolos, pães, biscoitos, e etc [10]. A farinha de milho tem aplicação em várias formas por ter seu sabor bem aceito pelos consumidores. É um produto de baixo custo e amplamente disponível no mercado [11]. Entre as principais preparações com a farinha de milho encontra-se a polenta, que era preparada pelas famílias provenientes da Itália [12]. Esta é uma

prática preservada pelos hábitos culturais dos descendentes de italianos que ainda são mantidos nos dias atuais na Região Sul.

Dentre os elementos essenciais os que constam nas tabelas de composição de alimentos conhecidas no Brasil, a tabela TACO [13], estão os elementos como cálcio, magnésio, sódio, potássio, fósforo, manganês, ferro, cobre e zinco que são elementos necessários para uma variedade de reações biológicas e sua deficiência pode ocasionar problemas à saúde humana. Além disto, quando ingeridos em grande quantidade os elementos considerados essenciais, podem tornar-se tóxicos [11].

Como o milho é um alimento bastante consumido pelos seres humanos, é relevante o desenvolvimento de métodos analíticos que permitam a avaliação dos elementos essenciais que constam na composição nutricional dos alimentos similares e ainda dos elementos não essenciais, sendo uma ferramenta poderosa para o estabelecimento de diversas ações em saúde, que se estendem da prescrição dietética até estudos sobre padrão de consumo alimentar [14].

A ingestão de alimentos funcionais fibrosos, como o milho, tem aumentado muito nos últimos anos e a procura por dietas naturais mais saudáveis vem ganhando grande importância nacional, levando a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a definir padrões de conformidade para este tipo de alimento [15, 16]. As pesquisas sobre a composição química estão sendo realizadas em vários países com o intuito de monitorar os teores dos elementos essenciais e não essenciais em farinha de cereais.

### **1.3 Proposta de preparo e caracterização de um material de referência de farinha de laboratório de milho**

O programa de certificação além de demandar tempo exige recursos financeiros, no entanto a maioria dos laboratórios não dispõe de tantos recursos necessitando que seus métodos sejam validados a fim de garantir a sua exatidão, a alternativa utilizada é o MRL.

Sabendo da necessidade de monitorar a concentração de micro e macroelementos em cereais e farinhas, torna-se claro a necessidade do desenvolvimento de MRL que possibilitem verificar a qualidade e ainda obter informações nutricionais deste tipo de alimento.

Os métodos de Análise por Ativação Neurônica (NAA) [17], Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES) [18] e Espectrometria de Fluorescência de Raio-X (XRF) [19], são técnicas analíticas que possibilitam a quantificação de metais e metalóides de forma simultânea são as mais aplicadas na verificação dos teores de elementos químicos em candidato a material de referência de alimentos como mostra a Tabela 1.

**Tabela 1.** Sistema de detecção utilizado na caracterização em candidatos a MR de alimentos.

<b>Matriz</b>	<b>Elementos</b>	<b>Técnicas Analíticas</b>	<b>Referência</b>
Folha de soja	Ca, Zn, Mn, Fe, Cu e V	ICP OES	[1]
Arroz integral	As, Br, Co, Cs, Fe, K, Na, Rb e Zn	INAA	[20]
Farinha de trigo	Cu, Fe, Mn, P, Sr e Zn	ICP OES	[81]
Peixe	As, Cd, Co e Pb	AAS	[21]
Tomate	g-HCH, fenitrotiona, clorpirifós e procimidona	CG	[2]
Repolho	Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Sr, Tl, W e Zn	ICP AES e ICP-MS	[9]
Leite em Pó	Pb, Cd e As	AAS e UV/Vis	[22]
Folha de Tabaco	As, Cd, Hg e Pb	INAA	[67]
Milho	bifenilos policlorados	CG-MS	[12]
Arroz	Cd, Zn, Mn e Cu	ICP OES	[13]
Mexilhão	As, Ca, Cl, Co, K, Mg, Mn, Na e Zn	INAA e AAS	[33]

O programa colaborativo interlaboratorial com a participação de laboratórios nacionais e internacionais, utilizando-se de protocolos estabelecidos para a avaliação estatística dos resultados bem como atribuição dos valores de propriedade e incertezas associadas, é uma etapa de grande importância no processo de certificação pois permite verificar a reprodutibilidade dos resultados obtidos.



---

---

## **CAPÍTULO II**

### **PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO MATERIAL DE REFERÊNCIA DE LABORATÓRIO DE FARINHA DE MILHO**

---

---

## 2.1 Panorama sobre a produção de materiais de referência

Alguns institutos nacionais e internacionais possuem vasta experiência no preparo e certificação de MRC, em matrizes como água, sedimentos, efluentes, minério, alimentos e outros. O NIST produz um grande número de MRC para compostos orgânicos e elementos químicos em diversos tipos de amostras [23]. Outro instituto internacional com ampla experiência é o Instituto para Materiais de Referência e Medições (IRMM), da União Europeia que preparou MCR para micro e macroelementos em amostras de cereais e farinhas derivada dos mesmos.

O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) e o Programa Nacional de Alimentação e Análise de Nutrientes Continuado (NFNAP), geram dados para o banco de dados USDA para MRC [24] com base em amostragem estatística e análise química da composição de nutrientes de alimentos [25-27].

O Departamento Nacional de Metrologia da França, em 1970 criou um banco de dados contendo todos os materiais de referência disponíveis até o momento e foram codificados como *Code of Reference Materials*, conhecido atualmente como COMAR [28]. Este banco de dados conta hoje com mais de 10.000 materiais de referência catalogados com base em suas aplicações, composições e propriedades.

Becker [29] descreveu os desafios para a caracterização dos primeiros MRC de matriz biológica folhas de pomar (NBS SRM 1571, *Orchard leaves*), que apesar do preparo ter começado em 1965 obteve o seu certificado apenas em 1971, na Divisão de Química da então Agência Nacional de Padrões dos Estados Unidos da América, NBS [29]. A partir desta época a produção de MRC começa a ser aprimorada, tanto com maiores cuidados na etapa de preparação, quanto na qualidade e a importância no conhecimento das fontes de incerteza dos métodos analíticos de forma que a caracterização obtida fosse a mais precisa e exata possível.

No Brasil, o Centro de Tecnologia Mineral (CETEM) dentre as suas atividades é responsável pela produção de MRC de amostras minerais. A produção ocorre de acordo com as carências do setor minero-metalúrgico e a distribuição é imediata. O CETEM também desenvolve MRC customizados a partir de material fornecido pelo cliente para atender a uma necessidade de aplicação específica ou especial [30].

O Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) possui o Laboratório de Referências Metrológicas (LRM), que desenvolve MRC desde 1975. Já foram produzidos mais de 130 tipos de MRC que têm amplo aproveitamento pela indústria, universidades, centros de pesquisa e desenvolvimento, agências reguladoras oficiais, entre muitas outras entidades do Brasil e de inúmeros países estrangeiros, com destaque para os Estados Unidos, Inglaterra, Alemanha, Coréia do Sul, entre outros. O LRM vem trabalhando com novos materiais de referência. Atualmente estão em andamento os seguintes projetos:

- Composição química de minérios de ferro;
- Composição química de calcários e dolomitos;
- Composição química de águas naturais;
- Ponto de fulgor e Ponto de Névoa de Derivados de Petróleo.

Um sumário sobre a produção de materiais de referência para determinação de nutrientes e composição de alimentos descrito por Phillips *et al.* [25], em que realizou-se um levantamento dos principais provedores de materiais de referência incluindo os principais componentes, vitaminas, macroelementos, microelementos, ácidos graxos, aminoácidos, e fitoquímicos selecionados (por exemplo, carotenóides). Foi comprovado neste trabalho que intervalo de incerteza para os principais componentes, minerais e oligoelementos eram inferiores a 10% do valor designado. As incertezas relativas foram significativamente maiores para vitaminas, sugerindo grandes desafios na medição e certificando os componentes. Por fim, os autores sugerem o cuidado que deve ser tomado na escolha de MRC para monitorar a análise da composição alimentar, concluindo que as avaliações dos níveis de incerteza atribuídos aos valores tidos como verdadeiros são necessários e que a medição dos sistemas analíticos de composição dos alimentos precisa de um exame mais detalhado e aprimorado [31].

Os laboratórios do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) produzem MRC segundo a Norma NIE-Dimci-030 e em conformidade com critérios aceitos internacionalmente estabelecidos na Associação Brasileira de

Normas Técnicas (ABNT) ISO Guia 34:2012. Dentre os MCR fornecidos têm-se soluções de calibração e multielementares, os quais permitem avaliar o teor de contaminantes inorgânicos e orgânicos em cachaça, água, combustíveis, medicamentos e outros. Além disto, recebem sugestões de novos tipos de MCR [32].

A escolha dos elementos a serem certificados depende de diversos fatores conforme a aplicação e a importância da determinação do elemento devido a sua toxicidade ou valor nutricional. No entanto, a disponibilidade de métodos analíticos validados, capazes de produzir resultados com incertezas associadas aceitáveis em um número razoável de laboratórios, bem como questões econômicas são fatores que limitam o número de elementos que são determinados e certificados em uma campanha de certificação [33].

### **2.1.1 Guia para preparo do material de referência de farinha de milho**

No desenvolvimento de MRL são necessários planejamentos que envolvam todas as etapas de caracterização e que sejam realizados seguindo as orientações das ISO GUIA de 30 a 35, além da ISO 13528. Até 2005 já foram traduzidas para o português as normas de 30 a 34 pela – ABNT [3, 4, 6, 34, 35, 36, 88].

ISO Guia 30, (1992) – apresenta os principais termos e os significados associados em relação aos materiais de referência.

ISO Guia 31, (2000) – apresenta as informações que devem constar em um certificado de material de referência.

ISO Guia 32, (1997) – descreve as recomendações gerais para problemas relacionados à calibração associada à análise química e a seleção e uso de materiais de referência internos e dos MRC.

ISO Guia 33, (2000) – apresenta recomendações para o uso de materiais de referências na verificação da exatidão de métodos.

ISO Guia 34, (2000) – é um guia para o produtor de MRC, com requisitos necessários para produção dentro de um sistema de qualidade quanto às instalações, planejamentos, preparação, armazenagem, ações pós-distribuição, entre outras.

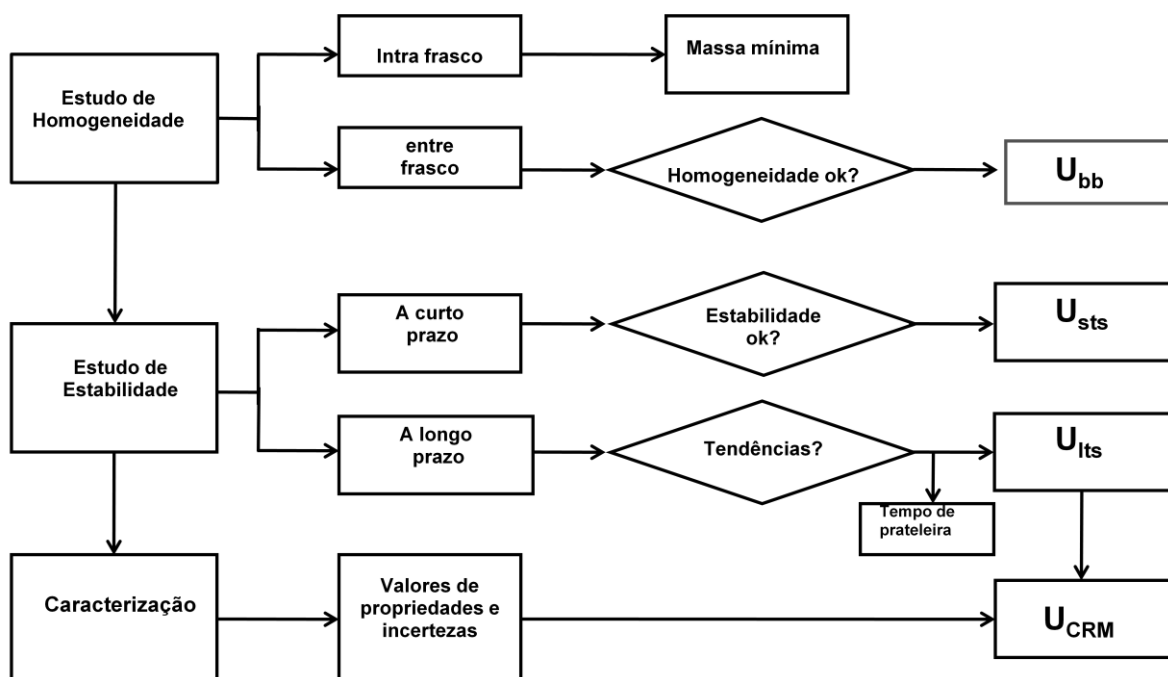
ISO Guia 35, (2006) - fornece os princípios estatísticos gerais para a certificação de materiais de referência enfocando também a análise estatística dos resultados obtidos. Este guia substitui a versão de 1989 que durante muitos anos foi utilizada para o tratamento dos dados.

ISO Guia 13528, (2015) - detalha os testes estatísticos para avaliar os ensaios interlaboratoriais permitindo demonstrar se os resultados de medição obtidos pelos laboratórios exibem ou não evidência de um nível aceitável de polarização.

### **2.1.2 Caracterização do material de referência de farinha de milho**

A caracterização do candidato a material de referência consiste em várias etapas: o processo de esterilização (a fim de evitar a proliferação de micro-organismos e invalidar o material) e a caracterização granulométrica (empregada com intuito de garantir a homogeneidade do tamanho das partículas estudadas). A quantificação dos elementos de interesse é uma das etapas mais importantes, nela verifica-se a homogeneidade do material definindo a massa mínima que poderá ser utilizada, a estabilidade a curto e a longo prazo com o objetivo de garantir condições de transporte e armazenamento. Por fim, mas não menos importante, o estudo interlaboratorial que consiste em realizar uma série de análises químicas em frações do material por laboratórios, com a intenção de obter um valor próximo ao considerado como verdadeiro e uma incerteza que será associada à etapa **Figura 1** [3].

**Figura 1.** Guia das etapas de caracterização do material de referência.



Fonte: Van der Veen et. al., *Accred. Qual. Assur.*, 6, p. 290-294, 2001

### 2.1.3 Processo de esterilização com radiação gama

Com o intuito de evitar a proliferação de micro-organismos, bactérias, fungos, contaminações e preservar a amostra de alimento tornando possível estocá-la por longos períodos, vários métodos têm sido empregados: o congelamento, a secagem, o enlatamento, a preparação em conservas, o armazenamento em atmosfera controlada, a adição de aditivos e atualmente a irradiação, sendo considerado o mais eficiente o que aplica a radiação ionizante [37]

Definida pela ANVISA como um processo físico de tratamento, o processo de esterilização consiste em submeter o alimento já embalado ou a granel, a doses controladas de radiação ionizante com finalidades sanitária, fitossanitária e/ou tecnológica. A radiação ionizante tem sido aplicada com eficiência na conservação de alimentos [38].

As fontes de radiação ionizante aplicadas em amostras de alimentos são isótopos radioativos que emitem radiação gama, como por exemplo o  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{137}\text{Cs}$  e os raios X gerados por máquinas que trabalham com energia na faixa de 5-10 MeV, no entanto, esta radiação produzida pelos feixes de elétrons e raios X apresentam baixo poder de penetração o que dificulta o seu emprego na área de alimentos [39]. A radiação gama tem sido empregada na inibição de brotamento de batatas, retardando o amadurecimento de frutas e vegetais, na pasteurização e esterilização de vários produtos alimentícios devido a sua alta capacidade de penetração [40].

Dependendo da dose de radiação ionizante recebida, o processo passa a ter uma denominação específica. Para radiação menor que 1 kGy, é conhecido como radurização, indicado para retardar a maturação de frutas e verduras, quantidade que varia de 1 kGy a 10 kGy é a radicação, utilizada para controlar fungos na superfície dos alimentos e a radapertização, que produz efeitos semelhantes aos da esterilização, por eliminar os micro-organismos que decompõem os alimentos [41], as doses requeridas nesse processo geralmente estão entre 25 a 45 kGy.

Para amostras de alimentos, esta tecnologia destaca-se em todo o mundo. A irradiação de 40 tipos de alimentos já foi aprovada por autoridades de vigilância sanitária de 37 países, incluindo o Brasil [42, 43].

A técnica tem ampla aplicação como etapa preliminar no preparo de candidatos a MRL, por evitar a proliferação de fungos e micro-organismos, garantido a preservação das espécies inorgânicas.

#### **2.1.4 Caracterização granulométrica**

Distribuições de partículas homogêneas são preferidas para materiais de referência (MR), uma vez que tamanhos de partícula diferentes em um frasco de MR podem levar à segregação do material, interferindo na homogeneidade [44]. O problema é crítico para MR de matriz metálica ou geológica, nos quais a existência de partículas e agregados com fases diferentes é possível. O problema é menos crítico no caso de MR's de origem biológica, mas ainda assim, deve-se realizar a

caracterização da granulometria para garantir que os MR's sejam preparados com homogeneidade adequada [50]

Para MR de farinha, que são constituídos de diferentes formas com propriedades físicas características (por ex: tamanho do grão, geometria da partícula, densidade), além da concentração de elementos traços que variam significativamente nestas diferentes formas e são intrinsecamente não homogêneas em uma escala microscópica, a homogeneidade aparente é avaliada por cominuição que está relacionada à redução de um sólido com partículas grandes a um pó, constituído por pequenas partículas [45].

Em geral, a etapa de moagem é empregada para obter uma amostra tão homogênea quanto possível. Além disso, a diminuição do tamanho de partículas acarreta um aumento da área superficial da amostra, o que facilita a dissolução em solvente ou o ataque ácido para a decomposição. Entretanto, esta etapa pode causar problemas críticos na análise, tais como risco de contaminação e perdas de elementos ou compostos voláteis, pois os sistemas de moagem podem promover um aquecimento da amostra. Outro possível problema é ausência de padronização deste procedimento para determinados tipos de amostras, o que acarreta problemas de reprodutibilidade para o procedimento de preparo ou moagem [46].

A distribuição e a forma do elemento a ser determinado também devem ser consideradas, pois dependendo da técnica de moagem empregada pode ocorrer segregação do material, o que resultaria em uma distribuição desigual do elemento de interesse em função do tamanho da partícula [45].

A escolha do procedimento de moagem depende de diversos parâmetros, tais como: quantidade e número de amostras, tipo de material a ser homogeneizado, tamanhos de partículas originais da amostra, tamanho de partículas que se deseja obter, características físicas e químicas da amostra e do equipamento de moagem, dureza do material, entre outros [47]. Estas técnicas incluem moagem mecânica convencional, moagem criogênica e moagem por jato de ar. Muitas das preparações são acompanhadas por uma classificação de tamanho e exclusão através de peneiramento ou separação por ciclone. Dependendo destas abordagens, os



tamanhos de partículas em MRC de matriz natural (planta) vão desde vários  $\mu\text{m}$  a centenas de  $\mu\text{m}$  com alguns MRC tendo até mesmo grandes partículas [48], isto significa que a avaliação do tamanho de partícula é importante considerando-se a velocidade do processo de digestão e homogeneidade.

Experiências têm mostrado que os procedimentos de homogeneização aplicados a uma ampla faixa de MRC (sedimentos, farinha e tecidos biológicos), não afetam com expressividade a concentração dos metais [49]

## **2.2 Caracterização dos elementos de interesse**

A caracterização dos elementos de interesse é feita segundo as recomendações da ISO GUIA 30-35, envolvendo as etapas de estudo de homogeneidade, verificando a massa mínima, estudo inter e intra frascos, o estudo de estabilidade a curto e a longo prazo, bem como o estudo interlaboratorial.

### **2.2.1 O estudo da homogeneidade**

O estudo da homogeneidade é um dos mais importantes para a produção de um candidato a material de referência, pois se não for bem executada poderá afetar seriamente a repetitividade além de comprometer a exatidão dos valores certificados. De acordo com a ISO GUIA 30 um material pode ser considerado homogêneo com respeito a uma determinada propriedade, quando o valor da propriedade, determinado por ensaios em amostra de tamanho adequado, encontra-se dentro dos limites de incerteza especificados. As alíquotas das amostras podem ser retiradas de embalagens diferentes ou de uma única embalagem. De modo geral a homogeneidade está relacionada a fatores como tipo do material, tamanho de amostra, tipos de analitos, requerimentos do usuário com respeito à exatidão e precisão da determinação [50].

Quando o material é acondicionado em recipientes adequados após estudos de homogeneização e estabilização, é essencial testar a representatividade do número

de recipientes para garantir que o material seja homogêneo, isto é, que os valores de propriedade medidos de uma porção sejam comparáveis a qualquer outra da série dentro de limites de incerteza aceitáveis. Portanto, a verificação da homogeneidade da distribuição dos analitos intra e inter-recipientes deve ser realizada. Neste caso, a homogeneidade é alcançada quando subamostras do tamanho (massa), necessário para os métodos analíticos usando INAA (análise de ativação de nêutrons), GF AAS (espectrometria de absorção atômica com forno de grafite) ou ICP OES (espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado) não apresentam diferença significativa dentro de limites de detecção do método [51], [21].

Não existe nenhuma regra para estudos de homogeneidade assim como o número de amostras a ser determinado [52]. No caso de MRC, a prática de uso comum do SM&T Programa (BCR) é que a homogeneidade do material seja verificada pela realização de determinações de 10 replicatas do elemento de interesse em um único recipiente (homogeneidade intra-recipiente) e por uma determinação em cada série de recipientes em intervalos regulares durante o procedimento de armazenamento (2-5% do número total de frascos que podem ser usados para homogeneidade inter-recipientes).

A ISO GUIA 35:2006 descreve um teste para homogeneidade, onde as unidades devem ser selecionadas aleatoriamente do estoque total, para atribuir a cada unidade a mesma possibilidade de seleção. Um planejamento experimental deve ser usado em que  $k$  unidades do material são selecionadas e  $n$  determinações de replicatas sejam realizadas para cada unidade. Recomenda-se que determinações sejam feitas ao acaso para evitar possíveis variações sistemáticas de tempo. As similaridades de  $k$  e  $n$  devem ser suficientemente grandes para detectar a possível existência de não homogeneidade em nível pré-determinado [4]

A falta de homogeneidade pode se manifestar de duas maneiras, quando variadas subamostras de uma unidade do material pode diferir sobre a propriedade de interesse ou ainda podem existir distinção entre as unidades do material. Diferenças entre subamostras têm condição de ser reduzidas ou controladas a um

nível baixo aceitável, tomando-se um tamanho da subamostra suficientemente grande. Frequentemente um estudo para o tamanho da subamostra é conduzido antes do início da certificação do material. Diferenças que possam existir entre unidades individuais do candidato a MR podem ser refletidas na incerteza para o relatório do certificado [1].

Em termos estatísticos, o preparo do MRL deve satisfazer aos seguintes objetivos:

1) detectar se a variação intrafrascos é estatisticamente expressiva em comparação com a variação conhecida do método;

2) detectar se a variação interfrascos é estatisticamente significativa em comparação com a variação intra frascos.

Além do estudo de homogeneidade das substâncias de interesse, o teste é também realizado em níveis diferentes de quantidades (ex: 50,100 e 200 mg) por algumas organizações a exemplo da INCT, IAEA, BCR [53-55]. A quantidade de amostra mínima recomendada para o usuário corresponde à menor quantidade na qual a homogeneidade será verificada. A não homogeneidade de um material é avaliada comparando-se coeficientes de variação (CV) ou desvios padrão relativos (RSD) das medidas obtidas de amostras de diferentes unidades com aquelas obtidas de porções de uma unidade.

Os coeficientes de variação (CV) ou RSD das medidas obtidas de diferentes amostras são também comparados com o CV ou RSD devido ao método analítico. O CV ou RSD do método analítico é usualmente obtido por medições do mesmo extrato ou digerido de uma amostra várias vezes.

O teste inicial de homogeneidade deve ser realizado por um único laboratório (geralmente pelo produtor do material) [4], onde o método aplicado deve ter boa repetitividade. Um alto grau de exatidão não é necessário na medida em que o único parâmetro de interesse é a diferença (se existir) entre amostras. Além disto, é muito importante obter dados de vários elementos ou compostos. No caso de metais em amostras de farinha, estes são quase sempre obtidos por procedimentos de

decomposição ou não da amostra, associados com a detecção final adequada. Estas investigações são realizadas para vários elementos que estão presentes na quantidade suficiente no material tal que a incerteza do método seja mínima.

Para MRC, todas as substâncias certificadas são geralmente testadas para homogeneidade. Uma boa homogeneidade pode ser obtida pela caracterização do tamanho da partícula e sua distribuição. Este conhecimento é particularmente importante quando materiais são preparados para determinação de metais em quantidade traço, os quais muitas vezes precisam de grandes quantidades de amostra (vários gramas). Em tais casos, a sensibilidade do método analítico não é suficiente para estimar o grau de homogeneidade em pequenas quantidades de amostra. Isto também significa que uma possível não homogeneidade é apenas um problema secundário e sua influência nas medidas pode ser desprezível. Portanto, o tamanho de amostra mínima a qual a homogeneidade é suficiente deve ser verificada e informada pelo produtor [4, 59]. Abaixo desta quantidade, a incerteza causada pela não homogeneidade reflete significativamente a incerteza dos valores de referência (ou certificados).

Um problema adicional é causado pela segregação de partículas durante o transporte e estocagem em longo prazo. Isto pode ser minimizado pela redução da distribuição do tamanho da partícula [49]. Cuidado especial deve ser tomado para a re-homogeneização do material antes da tomada da quantidade para teste, sendo que o produtor deve fornecer esta informação para o usuário.

Llauradó et al. [56], sugeriu a preparação de um material de referência de solo para determinação de radionuclídeos. Nesse trabalho foi realizada uma mistura de três solos, sendo dois da região do acidente de Chernobyl e um obtido em região não afetada. Foram realizados testes de homogeneidade intra e inter frascos, os resultados obtidos mostraram que não houve diferença significativa entre os resultados. O teste de estabilidade realizado também mostrou que não houve diferença significativa para as diferentes temperaturas e tempos de estocagem [56].

Cardoso et al. [2], verificaram a homogeneidade de um candidato a MRC para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros. Os agrotóxicos  $\gamma$ -HCH, fenitrotiona,

clorpirifós e procimidona foram adicionados à polpa de tomate. Fez-se uma avaliação de modo a prover dados sobre o tratamento mais adequado para minimizar a variabilidade analítica e garantir a qualidade do fruto. Depois da preparação, as amostras foram expostas à radiação gama na dose de 2 kGy e submetidas a um estudo interlaboratorial para certificação. As concentrações certificadas dos agrotóxicos após caracterização foram  $0,191 \pm 0,047 \text{ mg kg}^{-1}$ ;  $0,192 \pm 0,068 \text{ mg kg}^{-1}$ ;  $0,225 \pm 0,076 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $0,177 \pm 0,051 \text{ mg kg}^{-1}$  para o  $\gamma$ -HCH, a fenitrotona, clorpirifós e procimidona, respectivamente [2].

### **2.2.1.1 Incerteza associada à homogeneidade**

Na busca de um resultado tão próximo ao verdadeiro, um valor de incerteza associado é necessário e pode ser considerado um dos desafios no desenvolvimento do MR. Assim para cada etapa uma incerteza deve ser obtida [57]. Seguindo as recomendações da ISO Guia 35:2006 [4], O Guia de Quantificando e Incertezas em Medição analítica [91] ou ainda a GUM - Guia para a expressão de incerteza de medição [58].

### **2.2.2 O Estudo de Estabilidade**

Após comprovada a homogeneidade do candidato a material de referência, o próximo passo para o processo de caracterização é o estudo da estabilidade. Mesmo que o material tenha sido previamente irradiado leva-se em conta as variações que as amostras podem sofrer antes de serem analisadas, o que garante a integridade do material no período estudado. Neste estudo de estabilidade simulam-se condições que, provavelmente podem acelerar a degradação e promover a modificação da matriz ou ainda conversões do analito em outras espécies. Assim, alguns frascos do candidato a MR são acondicionados em temperaturas diferentes e analisados em função do tempo, com o intuito de avaliar variações nos analitos de interesse [51].

É comum que estudos de estabilidade sejam realizados em curto e longo prazo, onde no curto prazo as amostras são submetidas a temperaturas extremas

por dois meses com possibilidade de se estender até 12 meses visando obter informações adicionais ao longo do período de estocagem [4], simulando condições de transporte do provedor ao consumidor. E outro em longo prazo, na qual as amostras são mantidas na temperatura em que se pretende armazená-la.

A BCR realiza estudos de estabilidade em MRC de plantas em temperatura ambiente e na faixa de 20-40 °C [55, 59]. Para detectar problemas de reprodutibilidade de métodos analíticos em longo prazo, medições são também realizadas em amostras estocadas a -20 °C, em geral nesta temperatura alterações biológicas ou químicas são negligenciadas. Os resultados obtidos em 20 °C podem levar a uma avaliação da estabilidade da temperatura ambiente do laboratório considerando que os resultados obtidos a 40 °C são usados para avaliar as piores condições dos casos (ex: durante o transporte) e permite a avaliação da estabilidade do material durante longos períodos de tempo; na verdade admite-se que quando uma amostra é estável a 40 °C durante um ano, pode ser estável também em 20 °C por um longo período. Esta suposição não é considerada nos casos de deterioração por certas bactérias ou mofo em temperaturas favoráveis para o seu metabolismo, cerca de 20-35 °C. Entretanto, na maioria dos casos a água é removida em nível inferior a 5% ou as amostras são esterilizadas (radiação  $\gamma$ , aquecimento) para reduzir o número de germes. Isto dá uma garantia que deterioração por microrganismos não ocorrerão [59].

Recomendado pela ISO GUIA 35, de 2006, o método de regressão linear tem sido o mais aplicado para avaliar a estabilidade de um candidato a MR. Ele permite que seja verificada a relação entre duas variáveis, neste caso a concentração do analito em função do tempo. Se a inclinação da reta ou a não linearidade desta não forem significativas, ou seja, se a concentração dos elementos avaliados não variar em função do tempo, o material é considerado estável. Sendo assim, o candidato a MR é considerado estável quando apresentar o valor-p maior que 0,05 (95%), indicando que a inclinação da regressão linear é estatisticamente não significativa [4].

Puwastien *et al.* [60], aplicaram segundo a recomendação da ISO GUIA 35, o método de regressão linear para avaliar a estabilidade da vitamina B1 no material, uma vez que a vitamina pode não ser estável durante o transporte e armazenamento. A estabilidade foi monitorada durante todo o período de estudo, mantendo-se a  $-20^{\circ}\text{C}$  observou-se que a ordenada de origem da reta não é estatisticamente diferente do valor inicial. Os resultados implicaram em que a vitamina B1 no candidato a MR manteve-se estável durante todo o período de armazenagem de um ano [60].

### **2.2.2.1 Incerteza associada à estabilidade**

Na estimativa da incerteza associada à estabilidade, só é considerado o valor no longo prazo, que se relaciona com o tempo de prateleiras do material onde espera-se que quanto maior o tempo, maior a contribuição da incerteza para a estabilidade [61].

### **2.2.3 Caracterização: o programa interlaboratorial**

Um programa interlaboratorial pode ser definido como organização, realização e avaliação de ensaios em produtos ou materiais idênticos ou similares, por laboratórios diferentes, sob condições pré-determinadas podendo ter diversas finalidades, dentre elas certificação de material de referência [62].

A certificação consiste em uma atribuição de dados de concentração que seja tão próximo quanto possível do “valor verdadeiro”, que quando associada ao limite de incerteza torna-se um dos desafios no desenvolvimento de um MR. Nesta perspectiva a caracterização por estudos interlaboratoriais usando um ou vários métodos diferentes, tem sido adotado pela International Atomic Energy Agency (IAEA), Community Bureau Reference (BCR) e pelo NIST.

A definição para programa interlaboratorial envolve um conceito bastante abrangente: "uma série de medições de uma ou mais propriedades, realizadas

independentemente, por um grupo de laboratórios, em amostras de um material". Neste tipo de programa, a preparação do material, liderança e tratamentos de dados são as tarefas de um laboratório central [9].

O protocolo para execução dos estudos foi conciliado pela ISO, União Internacional de Química Pura e (IUPAC) e Associação Oficial de Química Analítica (AOAC) sendo reconhecido pelo Codex Alimentarius e União Européia [22]. Nele, uma ou várias amostras homogêneas são distribuídas a laboratórios, analisadas por analistas experientes utilizando metodologias reconhecidas como de referência, preferencialmente os métodos primários, junto com materiais de referência apropriados, em condições de repetitividade para garantir a rastreabilidade dos resultados que serão analisados estatisticamente para determinar "valores de referência" ou "informados" ou outros 24 que se atribuem aos diferentes elementos. Avaliam-se os dados para detectar valores discrepantes, determinar a distribuição dos dados aceitos, os valores médios e intervalo de confiança para cada elemento[63].

### **2.2.3.1 Testes realizados para verificar valores dispersos**

Os dados gerados em um processo de caracterização podem ser estabelecidos utilizando a comparação direta com MRC apropriados, em condições de repetitividade. Assim, o método é calibrado com o MRC fornecendo uma rastreabilidade direta e uma incerteza para o valor designado do material de referência. Os MRC devem ter matrizes apropriadas e uma faixa de concentração do analito que abrange ou está próxima daquela do candidato a material de referência [72].

A avaliação dos resultados de estudos interlaboratoriais para certificação de um material é geralmente realizada numa discussão técnica/química entre os participantes, onde também podem ser esclarecidas as técnicas analíticas aplicadas e as dificuldades observado, incluindo série de dados mostrando grande discrepância, valores de desvios padrão, grande ou muito pequeno; detecção de



erros sistemáticos, a exemplo de erros de calibração, interferências espectrais, valores de soluções brancas, entre outros.

No estudo interlaboratorial é necessário verificar os valores obtidos, com o intuito de constatar se todos pertencem ao mesmo conjunto de resultados. A estatística sugere alguns testes que confirmam se uma observância pode ser rejeitada. No entanto, não é possível afirmar se o resultado rejeitado é proveniente de um erro sistemático ou aleatório [64].

Os testes selecionados para avaliação interlaboratorial recomendados pela ISO 13528: 2015 são, o de Chauvenet, o de Dixon, Cochran [59, 65, 66] e Grubbs [61, 67].

O Teste de Cochran's é usado para analisar os desvios padrão nas medidas das replicatas dos laboratórios e para descartar os valores mais afastados atípicos, enquanto que o teste de Grubbs identifica resultados atípicos do intra e interlaboratorial e descartam estes do conjunto de dados [68].

Apesar dos testes estatísticos possibilitarem detectar valores dispersos, tem como inconveniente o fato que aumentando o número de medidas, também aumenta a probabilidade de ocorrências de grandes desvios padrão no conjunto de medidas. Entretanto, apenas as observações periféricas e a média de dados não são estimativas confiáveis da localização de dados e, portanto, diz-se ser um estimador não robusto.

Desta forma, mesmo aplicando os testes para identificação dos valores dispersos, dependendo do número de graus de liberdade (neste caso, número de laboratórios participantes - 1), a estimativa da média poderá ser afetada pelos valores extremos. A análise de dados utilizando estatística robusta tem sido recomendado pela ISO GUIA 35:2006 e a ISO 13528:2015, de modo a minimizar a influência de resultados extremos nas estimativas da média e desvio padrão [69].

### 2.2.3.2 Z-Score robusto

A robustez é definida como a medida de permanecer inalterado quando estiver sob a influência de pequenas variações no conjunto de dados. Assim o teste de robustez é aplicado quando é desejável identificar se algum valor do conjunto de dados tem influência significativa no resultado.

Com frequência, a mediana é adotada como a medida de tendência central e o intervalo quartílico como medida de dispersão.

Assim, o índice de desempenho é obtido com z-score robusto que é calculado como sendo  $z = (x_i - md)/IQN$ , sendo que  $x_i$  o resultado obtido pelo laboratório  $i$ ;  $md$  é o valor da mediana dos resultados do grupo para o parâmetro e  $IQN$  é a amplitude interquartílica normalizada dos resultados do grupo para o parâmetro.

A IQN, medida de dispersão equivalente ao desvio padrão da estatística clássica, vale lembrar que a IQN é um índice de variabilidade bastante estável, uma vez que não é influenciada pelos valores extremos e leva em consideração a totalidade dos valores da variável em estudo, sendo calculada através da Equação 1.

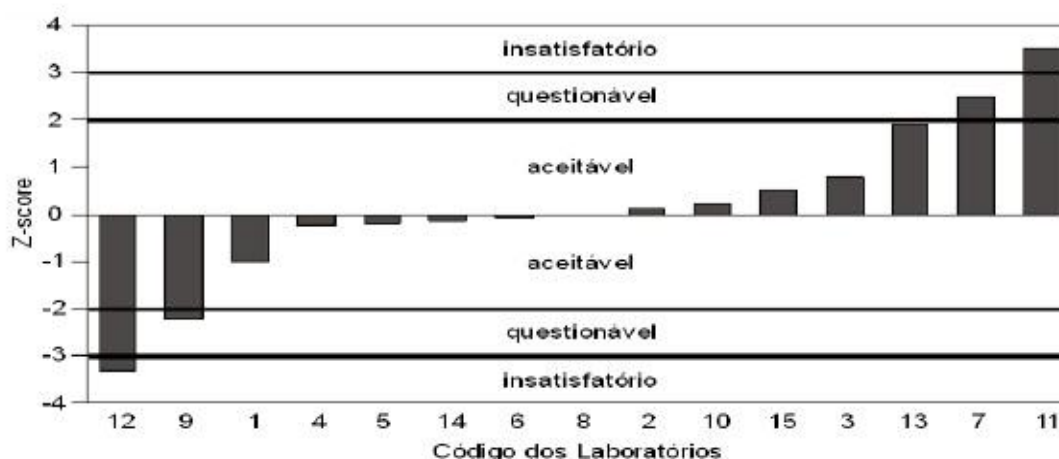
$$IQN = 0,74(Q_3 - Q_1) \quad \text{Equação 1}$$

Em que  $Q_1$  (primeiro quartil) é o valor que está situado de tal modo no conjunto de dados que uma quarta parte (25%) dos dados é menor e as três quartas partes restantes (75%), maiores do que ele;  $Q_3$  (terceiro quartil) é o valor que está situado de tal modo no conjunto de dados, que as três quartas partes (75%) dos dados são menores e uma quarta parte (25%), maior que ele; e 0,74 é o fator para uma distribuição normal/Gaussiana [65, 70]

Seguindo as recomendações da ISO 13528:2015 [88] que objetiva avaliar o desempenho dos laboratórios, o teste de z-scores robusto vem sendo aplicado para avaliar conjuntos de resultados, Krasheninina et al. (2015) [71], aplicaram a técnica no desenvolvimento de um material de referência de cloro ativo em água, onde os

valores de z-scores robusto obtidos por interpretados da seguinte forma:  $|z| \leq 2$  resultado satisfatório;  $2 < |z| < 3$  resultado questionável que exige medidas preventivas; e  $|z| \geq 3$  resultado insatisfatório exigindo medidas corretivas para o laboratório participante. A sua representação gráfica é ilustrada na Figura 2.

**Figura 2.** Representação gráfica do método de z-scores.



(adaptado Lopes, 2010)

A análise dos dados obtidos pelo programa interlaboratorial pode ser feita através do estudo estatístico entre duas variáveis utilizando uma técnica gráfica que baseia-se na elaboração de um diagrama de dispersão dos resultados associados a uma região de confiança conhecida como elipse, método proposto por Youden [73]. Assim é possível visualizar de forma simples e rápida a interpretação dos resultados, embora não forneça os parâmetros de repetitividade e reprodutibilidade.

Na elipse de confiança é feito o diagrama, onde cada laboratório é representado por um ponto cuja abscissa é a média das medições obtidas pelo laboratório para a amostra A e a ordenada é a média das medições do mesmo laboratório para a amostra B. Obtendo para duas variáveis não mais um intervalo de confiança, mas sim uma região de confiança com a forma de elipse [72].

A interpretação da elipse de confiança leva em consideração os seguintes aspectos:

a) Pontos dentro dos limites de 5% de significância (95% de confiança) da elipse de confiança representam laboratórios que obtiveram resultados satisfatórios, o que indica que os resultados apresentaram um bom nível de exatidão e repetitividade;

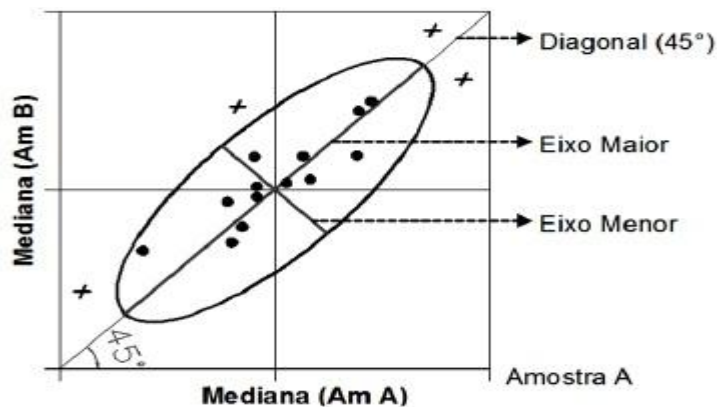
b) Pontos entre os limites de 5% e 1% de significância (95% e 99% de confiança, respectivamente) representam laboratórios que obtiveram resultados suspeitos. Estes laboratórios devem rastrear seus processos de medidas para averiguar desvios de procedimento e observar seus resultados em participações futuras nos ensaios de proficiência;

c) Pontos fora dos limites de 1% de significância representam laboratórios que obtiveram resultados insatisfatórios. Verifica-se então o quanto o ponto representativo do laboratório separa-se do resto dos dados. Se o laboratório não está seguindo o método de análise corretamente, seus resultados estarão sujeitos a erros sistemáticos e/ou aleatórios e o ponto obtido estará afastado da linha de 45° da elipse. Pontos afastados da linha de 45° representam participantes cuja repetitividade precisa ser melhorada. Pontos localizados no alto do 1º quadrante direito ou na extremidade inferior do 3º quadrante esquerdo refletem uma tendência a obter resultados mais altos ou resultados mais baixos em ambas amostras A e B, respectivamente. Estes laboratórios devem tomar ações corretivas para adequar seus procedimentos de medida.

Para os pontos situados dentro da elipse, se a dispersão é uniforme em uma elipse com eixo maior a 45° em relação ao eixo das abscissas (Figura 2), então o desempenho dos laboratórios pode ser considerado satisfatório, no entanto se a dispersão é uniforme em uma elipse com eixo maior tendendo à posição vertical ou à horizontal, não é possível afirmar que os laboratórios apresentam desempenho satisfatório, porque existem anormalidades com uma das amostras, A ou B. Estes problemas podem estar relacionados à falta de homogeneidade. Quando os pontos estão alinhados ao longo da linha de 45° a conclusão que pode ser tirada é que muitos dos laboratórios estão seguindo rigorosamente seus próprios métodos analíticos [73].

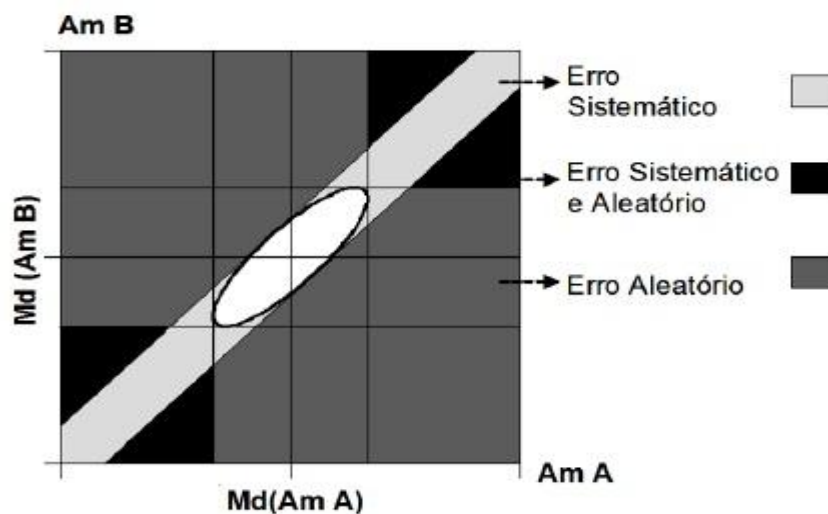
Para os pontos situados fora da elipse, afastados do eixo maior da elipse indicam erro aleatório significativo e ocorrem devido à variabilidade dentro do laboratório, podendo ter origem em operador não devidamente treinado, ou erros ocasionais (erro de leitura, de cálculo, em conversão de valores, em transcrição de dados etc.), contudo se estiverem próximos ao eixo maior da elipse indicam erros sistemáticos significativos e ocorrem devido a condições adversas do laboratório, podendo ter origem em modificações não permitidas na metodologia ou equipamentos não aferidos ou não calibrados. Figura 3 e 4.

**Figura 3.** Modelo representativo de uma elipse de confiança.



(adaptado de Olivieri, 2004)

**Figura 4.** Indicação dos tipos de erros possíveis no gráfico da elipse de confiança.



(adaptado de FORTES *et al.*, 2004).

### 2.3 A incerteza do candidato a material de referência

A incerteza associada ao candidato a material de referência é estimada por meio da Equação 2, recomendada pela ISO Guia 35: 2006[4],

$$U = k(u_{char}^2 + u_{bb}^2 + u_t^2)^{1/2} \quad \text{Equação 2}$$

A equação 2 representa a estimativa das incertezas expandidas associadas aos valores de concentração,  $U$ . Sendo levado em consideração a incerteza padrão devida à caracterização dos elementos no programa colaborativo,  $u_{char}$ , calculada no item anterior desse estudo, a incerteza padrão devida à homogeneidade entre frascos,  $u_{bb}$ ; e a incerteza padrão devida à estabilidade a longo prazo,  $u_t$ . Estas contribuições de incerteza são combinadas para que se possa calcular a incerteza padrão combinada, associadas aos valores de concentração,  $U$ . Tomando-se um fator de abrangência  $k = 2$  [22].

#### 2.3.1 A análise exploratória de dados como forma alternativa a Análise de Variância

Por recomendação do Guia ISO GUIDE 35, o processo de certificação de um material de referência, o estudo de homogeneidade e estabilidade são realizados por meio de métodos estatísticos univariados, como a análise de variância (ANOVA) [3]. No entanto, nos últimos anos, a análise de dados multivariados vem sendo aplicada aos dados químicos com objetivo de avaliar diferentes tipos de resultados, permitindo que informações obscuras mostradas pelo ajuste de dados sejam observadas.

A ferramenta estatística está relacionada com um conjunto de métodos estatísticos aplicados quando se possui muitas variáveis que são medidas de forma simultânea, em cada elemento amostral. Estas variáveis são correlacionadas entre si, e a análise se torna mais complexa por métodos comuns quando se possui um número grande de variáveis [74].

A análise multivariada de dados pode ser dividida em três grupos: um primeiro que consiste em na simplificação de variabilidade de dados (análise de componentes principais, análise fatorial, por correlações canônicas, por agrupamentos hierárquicos, discriminantes e de correspondência). Um segundo grupo que engloba as técnicas de interferências estatísticas (teste de hipótese, análise de variância, de covariância e regressão), e um terceiro que consiste em que utiliza as técnicas de calibração, porém geral ambos têm por objetivo simplificar a facilitar e interpretação dos fenômenos estudados [75].

Com o avanço da tecnologia computacional e dos softwares estatísticos, a estatística multivariada passou a ser aplicada não só na psicologia, ciências sociais e biológicas, como também em diferentes áreas como a geologia, química, física e outras. Quando aplicado ao tratamento de dados químicos passou a chamar-se quimiometria, do inglês "*chemometric*", ramo da química que utiliza ferramentas estatísticas e matemáticas para o planejamento e a otimização das condições experimentais e para a extração de informação química relevante de dados químicos multivariados [76].

Sem ocasionar uma perda relevante de informação, estas ferramentas estatísticas reduzem a complexidade do problema ao mesmo tempo em que evidencia as relações entre as variáveis constituintes da base de dados. Em uma análise o número de parâmetros (variáveis) em estudo é elevado e a representação gráfica de todo o conjunto de dados auxilia e facilita a interpretação dos resultados. Portanto, alguns algoritmos foram gerados com o intuito de elaborar gráficos que representem a maior quantidade possível das informações contidas em um conjunto de dados analíticos. Destacam-se os métodos de reconhecimento e/ou classificação de padrões, utilizados para agrupar amostras em categorias segundo suas similaridades. Duas técnicas de análise multivariada de dados são usadas, a análise de agrupamento hierárquico (HCA) e a análise de componentes principais (PCA) [76, 77].

### 2.3.1.1 Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA)

A análise de agrupamento, conglomerados, ou cluster, tem por finalidade dividir os elementos da amostra, em grupos de forma que os elementos pertencentes ao mesmo grupo sejam similares entre si (homogêneos), e os elementos diferentes sejam heterogêneos com relação às mesmas variáveis avaliadas [74].

As técnicas de agrupamento ou cluster são classificadas como hierárquicas e não hierárquicas. As técnicas hierárquicas são utilizadas na maioria das vezes com o intuito de identificar possíveis agrupamentos e o valor provável do número de grupos. Já as não hierárquicas torna-se necessário que o número de grupos já esteja pré-especificado [74].

Através da propriedade de hierarquia é possível construir um gráfico, conhecido como dendograma, que é representado em forma de “árvore” no qual a escala vertical indica a similaridade ou dissimilaridade. No eixo horizontal são indicados os elementos amostrais, enquanto que no vertical tem-se a altura correspondente ao nível com o qual os elementos foram considerados semelhantes [74].

A similaridade entre as amostras é analisada medindo-se inicialmente as distâncias entre os pares de amostras e inserindo num mesmo agrupamento aquelas com menores distâncias entre si. A maneira mais usual de calcular a distância entre duas amostras a e b no espaço n-dimensional é conhecida por distância euclidiana ( $X_{ab}$ ) e é dada pela Equação 3:

$$X_{ab}^2 = \sum_{j=1}^n (d_{aj} - d_{bj})^2 \quad \text{Equação 3}$$

Assim, quanto menor for a distância, maior será a similaridade dos elementos comparados e as distâncias calculadas podem auxiliar na busca por similaridade entre as amostras.

O método de Ward's é usado no agrupamento de dados que forma grupos de maneira a atingir sempre o menor erro interno entre os vetores que compõem cada grupo e o vetor médio do grupo, também conhecido como método de mínima



variância. Isto equivale a buscar o mínimo desvio padrão entre os dados de cada grupo. Este método tende a produzir grupos com aproximadamente o mesmo número de elementos e tem como base principal os princípios da análise de variância. Fundamenta-se nos seguintes princípios [74]:

- 1) Cada elemento é considerado como um único agrupamento;
- 2) Em cada passo do algoritmo de agrupamento calcula-se a soma de quadrados dentro de cada grupo, que representa a distância euclidiana de cada elemento amostral, isto é,

$$SS_i = \sum_{j=k}^{n_i} (X_{ij} - \bar{X}_i)' (X_{ij} - \bar{X}_i) \quad \text{Equação 4}$$

em que,  $n_i$  é o número de elementos no grupo  $C_i$  quando se está no passo  $k$  do processo de agrupamento,  $X_{ij}$  é o vetor de observações do  $j$ -ésimo elemento amostral que pertence ao  $i$ -ésimo conglomerado,  $\bar{X}_i$  é o centróide do conglomerado  $C_i$  e  $SS_i$  representa a soma de quadrados correspondente ao conglomerado  $C_i$ . No passo  $k$ , a soma de quadrados total dentro dos grupos é definida como:

$$SS_R = \sum_{i=1}^{g_k} SS_i \quad \text{Equação 5}$$

em que  $g_k$  é o número de grupos existentes quando se está no passo  $k$ . A distância entre os grupos  $C_l$  e  $C_i$  é, então, definida como:

$$d(C_l, C_i) = \left[ \frac{n_l n_i}{n_l + n_i} \right] (X_{ij} - \bar{X}_l)' (X_{ij} - \bar{X}_i) \quad \text{Equação 6}$$

Que é a soma de quadrado entre os clusters  $C_l$  e  $C_i$ . Em cada passo do algoritmo de agrupamento, os dois grupos que minimizam a distância são combinados.

Quando se deseja avaliar a homogeneidade e de um candidato a material de referência, o que se espera é que ocorra a formação de grupos homogêneos, composto por alíquotas retiradas de diferentes frascos, então será observada a formação de grupos homogêneos de amostras distintas. Ao avaliar a estabilidade, as

mesmas perspectivas são esperadas, formação de grupos homogêneos e alíquotas de diferentes temperaturas e datas, comprovando a estabilidade do material.

### **2.3.1.2 Análise de Componentes Principais (PCA)**

Descrita por Karl Pearson, em 1901, a técnica foi consolidada por Hotelling em 1933 e 1936 [78], cujo princípio baseia-se na redução da dimensionalidade do conjunto de dados originais, preservando a maior quantidade de informação (variância) possível. As n-variáveis geram, através de suas combinações lineares, n-componentes principais, cuja característica fundamental, além da ortogonalidade, é que são obtidos em ordem decrescente de máxima variância[79].

A PCA é considerada um método fatorial, pois a redução do número de variáveis não é feita por uma seleção de algumas delas, mas pelo estabelecimento de novas variáveis ortogonais entre si, denominadas componentes principais (PC's), obtidas pela combinação linear das variáveis iniciais, por meio dos fatores [80]. As componentes principais (PC's) são as variáveis não correlacionadas, adquiridas multiplicando-se as variáveis correlacionadas originalmente com os autovetores (pesos). Os autovalores das PC's são as medidas das discrepâncias associadas à participação das variáveis originais nas PC's e são determinados pelos pesos. Os elementos de transformação das novas valores são chamados de escores [77]. As PC's são organizadas em ordem decrescente de importância e os gráficos obtidos através da análise representam as amostras em um sistema cartesiano onde os eixos são as PC's.

O HCA e o PCA são técnicas complementares e tem sido aplicada com sucesso na elucidação e caracterização de dados analíticos em diversos tipos de amostras. O PCA pode ser aplicado na análise de dados com os seguintes objetivos: redução de dimensionalidade dos dados, simplificação estrutural, agrupamento de objetos, modelagem, detecção de outlier, seleção de variáveis, previsão, etc [77]. Além disto, o PCA por matriz de correlação não é influenciada por fatores de alta variância, porque o PCA exibe os dados na mesma ordem de grandeza da escala medida [81]. Este recurso pode ser muito útil para o estudo de homogeneidade de

candidato a material de referência devido à alta variabilidade dos dados obtidos por determinação da macro e microelementos. Contudo, um pequeno número de trabalhos descritos na literatura utilizou PCA para avaliar a homogeneidade dos materiais de referência candidatos.

Lima *et al.* [81], aplicaram a análise multivariada de dados como forma alternativa para avaliação da homogeneidade de um candidato a material de referência onde, para o ensaio de homogeneidade entre recipientes, três repetições foram tomadas a partir de cada um dos 10 frascos selecionados dos 100 frascos obtidos. Os resultados foram avaliados aplicando teste F, que demonstrou não haver diferença significativa para os resultados inter frascos. Indicando a homogeneidade do material. Em seguida, a influência da massa da amostra sobre a homogeneidade do material também foi avaliada por quantificação de elementos para 100, 300, 500, 700 e 1000 mg de massas de amostra. O Teste F também foi utilizado para a avaliação destes resultados e mostraram que o material é homogêneo para massas tomadas na gama de 100 a 1000 mg. Todos estes resultados foram ainda avaliados empregando a PCA e HCA. Ambas as técnicas, também mostraram que o material é perfeitamente homogêneo para utilização como material de referência de laboratório [81].

Nogueira *et al.* [82], propuseram em seu trabalho a utilização da análise multivariada para a avaliação de resultados experimentais do teste de homogeneidade de dois novos CRM de ingredientes farmacêuticos ativos (API): metronidazol e captopril. A PCA e HCA indicaram que alguns resultados do teste de homogeneidade foram estatisticamente diferentes quando as concentrações de todas as impurezas da API foram consideradas de forma simultânea. Através do uso dessas ferramentas estatísticas, foi possível reduzir a incerteza padrão devido a inter garrafa (in) homogeneidade ( $u_{bb}$ ) e, como consequência, a incerteza padrão combinada dos materiais de referência certificados ( $u_{CRM}$ ), com nível de confiança de 95%. Indica ainda ser uma maneira rápida e fácil de avaliar a homogeneidade do candidato a material de referência de medicamentos.

Na avaliação de homogeneidade e estabilidade de um candidato a material de referência, a HCA e a PCA permitem confirmar ou não se o material é homogêneo e estável de forma visualmente, em alguns casos conseguem informação mais detalhadas que não são obtidas pela ANOVA [81].

## **2.4 Objetivos**

### **2.4.1 Objetivo geral**

O presente trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar um novo material de referência de farinha de milho para avaliar a exatidão de métodos analíticos.

### **2.4.2 Objetivos específicos**

- Produzir um material de referência (MR) de Farinha de Milho
- Apresentar um estudo de homogeneidade para candidato a material de referência de farinha de milho, considerando os resultados quantitativos de nove elementos nas amostras.
- Aplicar os métodos estatísticos univariado e multivariado (ANOVA e PCA) para avaliar a homogeneidade do candidato material de referência.
- Aplicar a análise de agrupamento hierárquico (HCA) para avaliar a estabilidade do candidato a material de referência, como método alternativo ao proposto pela ISO Guia 35.
- Caracterizar o MR através de um estudo interlaboratorial.
- Aplicar as técnicas de elipse de confiança e PCA para avaliar os resultados do estudo interlaboratorial.

## **2.5 Parte experimental**

### **2.5.1 Instrumentação**

Neste trabalho um Espectrômetro de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES), Varian modelo Vista PRO (Mulgrave, Austrália) com configuração axial e um detector de dispositivo de carga acoplada foi utilizado para a determinação multi elementar. As condições dos parâmetros instrumentais utilizados foram: gerador de radio frequência (40 MHz), potência (1,3 kW), o fluxo de plasma (15 L min<sup>-1</sup>), o fluxo auxiliar (1,5 L min<sup>-1</sup>), e fluxo nebulizador (0,7 L min<sup>-1</sup>). Os elementos e o comprimento de onda (nm) utilizados foram: Ca II (422,673), Cu II (237,395), Fe II (238,204), K (766,491), Mg II (279,553), Mn II (257,610), Mo (204,598 ), P (213,618) e Zn II (202.548), foram usados como linha de emissão atômica (I) linha de emissão iônica (II).

Para a determinação dos micro e macro elementos, o sistema óptico do ICP OES foi calibrado com solução de referência multielementar e o alinhamento da tocha foi realizado com uma solução de Mn 5,0 mg L<sup>-1</sup>. As linhas espectrais foram selecionadas considerando as intensidades dos sinais de emissão, sensibilidade e ausência de interferências.

Um bloco digestor, modelo TE-040/25, da Tecnal (São Paulo, Brasil) foi utilizado para a digestão ácida das amostras de farinha de milho e do CRM de farinha de arroz.

### **2.5.2 Reagentes e soluções**

Água ultrapura obtida a partir de um sistema de purificação de água Milli-Q da Millipore (Millipore, MA, USA), com resistividade de 18 MΩ cm, foi usada ao longo dos experimentos. Os reagentes, ácido nítrico (Merck, Darmstadt, Alemanha) e peróxido de hidrogênio (Merck) foram de grau analítico.

As soluções padrão de trabalho) de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, P, e Zn foram preparados diariamente através da diluição da solução estoque contendo 1000 mg L<sup>-1</sup> (Titrisol Merck).

### **2.5.3 Preparo do candidato a material de referência**

Amostras de farinha de milho utilizadas foram do mesmo fabricante, com diferentes lotes, adquiridas em supermercados do Estado da Bahia. Sete quilogramas de farinha de milho foram usados para a produção do candidato a material de referência de laboratório.

O material foi submetido à radiação gama de 15 kGy para evitar a proliferação de fungos e bactérias. Em seguida, o material foi colocado em um recipiente de polietileno para homogeneização. Após o nível de homogeneidade satisfatório ser alcançado, a farinha de milho foi então transferida para frascos de polietileno com tampa. Cerca de 80 g do material foram transferidos para cada frasco, em um total de 100 frascos. Os recipientes utilizados permitiram um armazenamento hermético e estes foram identificados com o nome do material e o número de cada frasco em uma sequência de 1 a 100.

### **2.5.4 Procedimento para decomposição da farinha de milho e determinação dos elementos**

As amostras foram analisadas em triplicata para determinar os elementos de interesse. Cerca de 2 g da amostra foram digeridos com uma mistura de 2 mL de ácido nítrico 65% (m/m) e 1 mL de peróxido de hidrogênio 30% (m/m) e, em seguida, aquecida no bloco de digestor, até obter uma solução límpida. Logo após, o conteúdo digerido foi quantitativamente transferido para balões volumétricos e avolumados para 10 mL com água ultrapura. Brancos analíticos foi efetuada de forma semelhante. A determinação de todos os elementos (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, P e Zn) foi realizada pela técnica de Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES).

### **2.5.5 Avaliação da exatidão**

A exatidão do método utilizado para a digestão e quantificação de Ca, K, Mg, P, Zn, Cu, Fe, Mn e Mo em amostras de farinha de milho por ICP OES foi confirmada pela análise do material de referência certificado de farinha de arroz (NIST 1568a) fornecido pelo Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (Gaithersburg, MD, EUA). A análise deste CRM foi realizada utilizando o mesmo procedimento tal como aplicada para as amostras de farinha de milho. Aos resultados foi aplicado o teste *t* pareado de Student a um nível de confiança de 95%.

### **2.5.6 Estudo de homogeneidade**

O estudo homogeneidade foi realizado em amostras representativas de todo o lote. Vinte frascos do candidato a material de referência de farinha de milho foram selecionados aleatoriamente para o estudo, dentre estes, foram retiradas três subamostras de cada unidade para análise. Os passos para este teste foram os seguintes:

1) O estudo da influência da massa da amostra sobre a homogeneidade do candidato a material de referência, para o qual foram avaliadas as quantidades de 100, 200, 300, 400 e 500 mg de amostra;

2) Estudo da homogeneidade entre frascos, em que foram avaliados os resultados de medidas realizadas entre 9 unidades do candidato a MRL;

3) A homogeneidade intra frasco, que foi avaliada através da análise da subamostra de uma unidade selecionada.

Todos os experimentos foram realizados quantificando os elementos Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, P e Zn.



## 2.6 Análise estatística

### 2.6.1 Avaliação da homogeneidade de acordo com a ISO Guia 35:2006

O estudo de homogeneidade foi realizado utilizando nove frascos do candidato a CRM. Estes foram selecionados de forma aleatória e analisados como descritos no procedimento acima. Em seguida, foi realizada a análise de variância (ANOVA) com os resultados das medidas para avaliar a homogeneidade. De acordo com as recomendações da ISO Guia 35:2006, as incertezas devido à falta de homogeneidade entre-frascos ( $u_{bb}$ ) pode ser calculadas pelas equações (7) ou (8):

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MS_{inter} - MS_{intra}}{n_0}}$$

Equação 7

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MS_{inter}}{n}} \cdot \sqrt[4]{\frac{2}{v_{MS_{intra}}}}$$

Equação 8

onde  $MS_{inter}$  é a média do quadrado entre as unidades de lote de MRC (ANOVA),  $MS_{intra}$  é o média do quadrado dentro das unidades de lote de MRC (ANOVA), e  $n_0$  é o número de repetições. Quando  $MS_{inter}$  é maior do que  $MS_{intra}$ . Ambas as equações são aplicadas e o maior valor  $u_{bb}$  é escolhido. Por outro lado, se  $MS_{inter}$  é menor do que  $MS_{intra}$ , o que indica pobre repetitividade do método de medição, apenas a Equação (2) pode ser usada.

### 2.6.2 Avaliação da homogeneidade de acordo com a PCA

A análise de componentes principais através da matriz de correlação não é influenciada pelas variáveis de maior variância, sendo, portanto, de muita utilidade para este trabalho. Assim a PCA também foi aplicada à matriz de dados (Tabela 5 B) como um método estatístico alternativo à análise de variância. Os dados foram

autoescalados e os valores individuais das amostras processados utilizando o programa *Statistica 6.0*.

## 2.7 Estudo de estabilidade

O estudo de estabilidade a curto e a longo prazo foi realizado, com o intuito de avaliar as possíveis condições de estocagem e armazenamento do candidato a MR. Adotado o método isócronos todas as análises foram realizadas em condições de repetibilidade para minimizar a variabilidade das medidas [83]. Desta forma 18 frascos foram selecionados de maneira aleatória e grupos de seis deles foram mantidos acondicionados a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $+45\text{ }^{\circ}\text{C}$  cada, durante 0, 3, 6, 9, 12 e 15 meses, respectivamente. Em seguida, o material armazenado em cada temperatura foi analisado em triplicata para quantificação dos elementos de interesse, utilizando o mesmo procedimento do estudo de homogeneidade [84]

Seguindo as recomendações da ISO Guia 35:2006, a estabilidade foi estimada pelo quociente ( $R_t$ ), Equação 9.

$$R_t(T) = w_t(T)/w_t(T_{ref}) \quad \text{Equação 9}$$

onde  $w(t)$  corresponde a fração média da massa medida de um dado elemento, quando o material foi armazenado a temperatura  $T$  para um período de tempo  $t$ , e  $w_t(T_{ref})$  correspondente ao valor do material armazenado à temperatura de referência escolhido  $T_{ref} = + 25^{\circ}\text{C}$ . As frações de massa foram medidas em triplicata para se obter a média e desvio padrão relativo  $s_{rel, t}(T)$ , a partir do qual a incerteza de medida da  $R_t(T)$  foi derivada de:

$$u_t = (s_{rel, t}^2(T) + s_{rel, t}^2(T_{ref}))^{1/2} R_t(T) \quad \text{Equação 10}$$

Para uma estabilidade ideal, a razão deve ser  $R_t = 1$ . Na prática, no entanto, existem variações aleatórias devido à incerteza das medidas [18]. Se o intervalo  $R_t \pm u_t$  inclui o valor 1, pode-se garantir que as amostras são estáveis nestas condições de estocagem [61].

### 2.7.1 Avaliação da homogeneidade de acordo com HCA

A análise de agrupamento hierárquico (HCA) é uma técnica multivariada exploratória que visa agrupar as amostras com base na similaridade dos resultados dos participantes e as diferenças entre membros de diferentes grupos. Há um número de métodos disponíveis para estabelecer grupos, tais como o método de Ward's, utilizando a análise de variância para avaliar as distâncias entre grupos [20].

A semelhança entre as amostras são representados em diagramas de duas dimensões chamados de dendrogramas. O HCA possibilita, de forma alternativa avaliar a estabilidade do candidato a MRL por possibilitar a formação clara de grupos homogêneos [85, 86]. A formação de grupos homogêneos de amostras avaliadas em temperatura heterogênea é uma indicação da estabilidade. Para avaliar a estabilidade de formação de agrupamento de amostras avaliadas à mesma temperatura iria proporcionar uma sugestão sobre a instabilidade.

Os dados foram autoescalados e os valores individuais das amostras processados utilizando o programa *Statistica 6.0*.

## 2.8 Estudo Interlaboratorial

O estudo interlaboratorial foi realizado a partir da comparação entre laboratórios. Cada um dos 13 laboratórios participantes receberam duas unidades do frasco contendo o candidato a MR, escolhido de forma aleatória, e foram convidados a quantificar os analitos de interesse fazendo uso de procedimentos de rotina.

O conjunto de resultados apresentados pelos participantes foi analisado estatisticamente usando testes de Grubbs e Cochran [**Erro! Indicador não definido.**]. O teste de Grubbs foi utilizado para detectar valores dispersos na população dos resultados individuais e na população de meios laboratoriais, enquanto que o teste de Cochran foi usado para identificar valores dispersos nas variâncias de laboratório. Ao conjunto de dados aceitos foi aplicada a técnica de elipse de confiança.

### 2.8.1 Elipse de confiança

O gráfico da elipse de confiança é utilizado para verificar a compatibilidade entre os laboratórios, e segue o método de Youden [73]. A construção deste gráfico prevê a distribuição de um par de amostras, sendo construída para cada elemento e cada laboratório é representado por um ponto. A estatística robusta foi utilizada para calcular os valores de z-scores robusto [87], e médias robustas para as elipses, conforme recomendado pela ISO GUIA 13528:2015 [88]. O software Labwin-PEP, versão 4.3.01 [89] foi utilizado para traçar as elipses.

Assim, os pontos dentro dos limites de 95% de confiança da elipse representam laboratórios que obtiveram resultados satisfatórios. Pontos entre os limites de 95% e 99% de confiança, respectivamente, representam laboratórios que obtiveram resultados questionáveis. Pontos fora dos limites de 99% de confiança representam laboratórios que obtiveram resultados insatisfatórios [90].

A incerteza padrão associada à caracterização ( $U_{char}$ ) foi calculada a partir dos parâmetros obtidos da ANOVA [4], indicados na equação 11.

$$u^2_{char} = [(MS_{among} - MS_{within}) + MS_{within}]/pn = MS_{among}/np \quad \text{Equação 11}$$

Onde:

$MS_{among}$  e  $MS_{within}$  são intra e entre grupos fornecidos pela ANOVA, n é o número de medidas realizadas por cada participante e p é o número de laboratórios participantes do estudo.

### 2.9 Incerteza combinada

A incerteza expandida U dos valores medidos das frações de massa de cada elemento no candidato RM da farinha de milho foi obtido combinando as incertezas da homogeneidade ( $u_{bb}$ ), estabilidade ( $u_t$ ) e caracterização de materiais ( $u_{char}$ ), como mostrado na equação 12. O intervalo de +/- U em torno do valor atribuído de fração

de massa elemento engloba valores de medição que pode representar a medida a um determinado nível de confiança [2, 3, 91]. A escolha do fator  $k$  é baseada no grau de confiança desejado, onde para aproximadamente 95%, o valor de  $k$  é 2 [Erro! Indicador não definido.].

$$U = k (u_{\text{char}}^2 + u_{\text{bb}}^2 + u_{\text{t}}^2)^{1/2} \quad \text{Equação 12}$$

## 2.10 Discussão e resultados

### 2.10.1 Validação do método analítico usado para a quantificação dos elementos

Alguns parâmetros analíticos foram avaliados para o processo de validação do método utilizado para a quantificação dos elementos.

#### 2.10.1.1 Sensibilidade

Os valores de limite de detecção (LD) e quantificação foram calculados de acordo com a IUPAC [92]. O LD deve ser determinado dividindo o valor correspondente a três vezes o desvio padrão do sinal analítico do branco, obtido a partir de 10 medidas, pela inclinação da curva analítica.

$$\text{LD} = \frac{3S_{\text{Br}}}{b} \quad \text{Equação 13}$$

Para calcular o limite de quantificação (LQ), divide-se o valor correspondente a dez vezes o desvio padrão do branco pela inclinação da curva analítica.

$$\text{LQ} = \frac{10S_{\text{Br}}}{b} \quad \text{Equação 14}$$

Desta forma, o LD e LQ calculados ( $\text{mg L}^{-1}$ ) para a o método utilizado foram: 0,19 e 0,65 para o Ca; 0,04 e 0,12 para o K; 0,11 e 0,38 para Mg; 0,78 e 2,62 para a P; 0,04 e 0,14 para Zn; 0,001 e 0,004 para o Cu; 0,06 e 0,20 para Fe; 0,003 e 0,009 para Mn; e 0,03 e 0,10 para Mo, respectivamente. Estes limites também foram expressos como miligramas do elemento por quilograma de amostra para uma massa amostra de 400 mg, e eles foram: 5,8 e 19,4 para o Ca; 1.1 e 3.7 para K; 3,4 e 11,3 para o Mg; 23,5 e 78,4 para a P; 1,21 e 4,04 para Zn; 0,04 e 0,12 para o Cu; 1,79 e 5,97 para Fe; 0,08 e 0,27 para Mn; e 0,94 e 3,12 para Mo, respectivamente.

#### **2.10.1.2 Precisão**

A precisão do método foi avaliada como o desvio-padrão relativo (RSD) para os nove elementos, considerando-se uma massa de amostra de 400 mg ( $n = 10$ ). Desta forma, os valores de desvio padrão relativo foram de: 1,8%, 2,9%, 1,4%, 0,5%, 4,1%, 3,7%, 4,0%, 7,4% e 2,8% para Ca, K, Mg, P, Zn, Cu, Fe, Mn e Mo, respectivamente.

#### **2.10.1.3 Exatidão**

A exatidão do método utilizado para a quantificação de Ca, K, Mg, P, Zn, Cu, Fe, Mn e Mo em amostras de farinha de milho por ICP OES foi confirmada pela análise do material de referência certificado de farinha de arroz (NIST 1568a). Os resultados da aplicação do teste  $t$ -pareado a um nível de confiança de 95% demonstraram que este método é estatisticamente satisfatória para a determinação de todos os elementos envolvidos no processo de certificação Tabela 2.

**Tabela 2.** Resultados obtidos para o material de referência certificado de farinha de arroz SRM 1568a ( $n = 3$ ).

<b>Elemento</b>	<b>Valor certificado</b>	<b>Valor encontrado</b>
Ca (%)	0,0 118 $\pm$ 0,0006	0,0121 $\pm$ 0,0009
K (%)	0,1280 $\pm$ 0,0008	0,1245 $\pm$ 0,0216
Mg (%)	0,056 $\pm$ 0,002	0,057 $\pm$ 0,005
P (%)	0,153 $\pm$ 0,008	0,149 $\pm$ 0,042
Zn (%)	19,4 $\pm$ 0,5	19,3 $\pm$ 0,5
Cu (mg Kg <sup>-1</sup> )	2,4 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,1
Fe (mg Kg <sup>-1</sup> )	7,4 $\pm$ 0,9	7,6 $\pm$ 1,1
Mn (mg Kg <sup>-1</sup> )	20,0 $\pm$ 1,6	19,9 $\pm$ 4,0
Mo (mg Kg <sup>-1</sup> )	1,46 $\pm$ 0,08	1,35 $\pm$ 0,01

## 2.10.2 Estudo de homogeneidade

### 2.10.2.1 Estudo da massa mínima para o candidato a Material de Referência

O estudo da massa mínima teve por objetivo avaliar a equivalência entre a massa e a concentração das espécies Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn, no candidato a MRL de Farinha de Milho. Com o intuito de verificar a massa mínima em que fosse possível quantificar o maior número de analitos, por ICP OES, a massa da amostra foi estudada a uma faixa de 100 a 500 mg. Análise de variância (ANOVA) foi aplicada para a matriz de dados reais a um nível de significância de 5%. Este teste estatístico é recomendado pelo Guia ISO 35 e é utilizado na maioria dos trabalhos que envolvem a preparação de um CRM [81]. A fim de fornecer um teste alternativo à avaliação da homogeneidade a PCA foi aplicada aos valores individuais das amostras. Os resultados são apresentados na **Tabela 16** (Apêndice).

**Tabela 3.** Resultados da ANOVA para o estudo de homogeneidade entre frascos para 100, 200, 300, 400 e 500 mg de amostra.

Elemento	MS <sub>Between</sub>	MS <sub>Within</sub>	F* <sub>cal</sub>	p-value
Ca	3,57	32,1	0,11	0,98
K	559,9	1774	0,32	0,86
mg	18,9	41,0	0,46	0,76
P	57,2	654,9	0,09	0,98
Cu	0,0016	0,0131	0,12	0,97
Fe	0,148	1,31	0,11	0,98
Mn	0,0038	0,0057	0,66	0,63
Zn	0,0270	0,0715	0,38	0,82

\*F<sub>crítico</sub> = 3,48

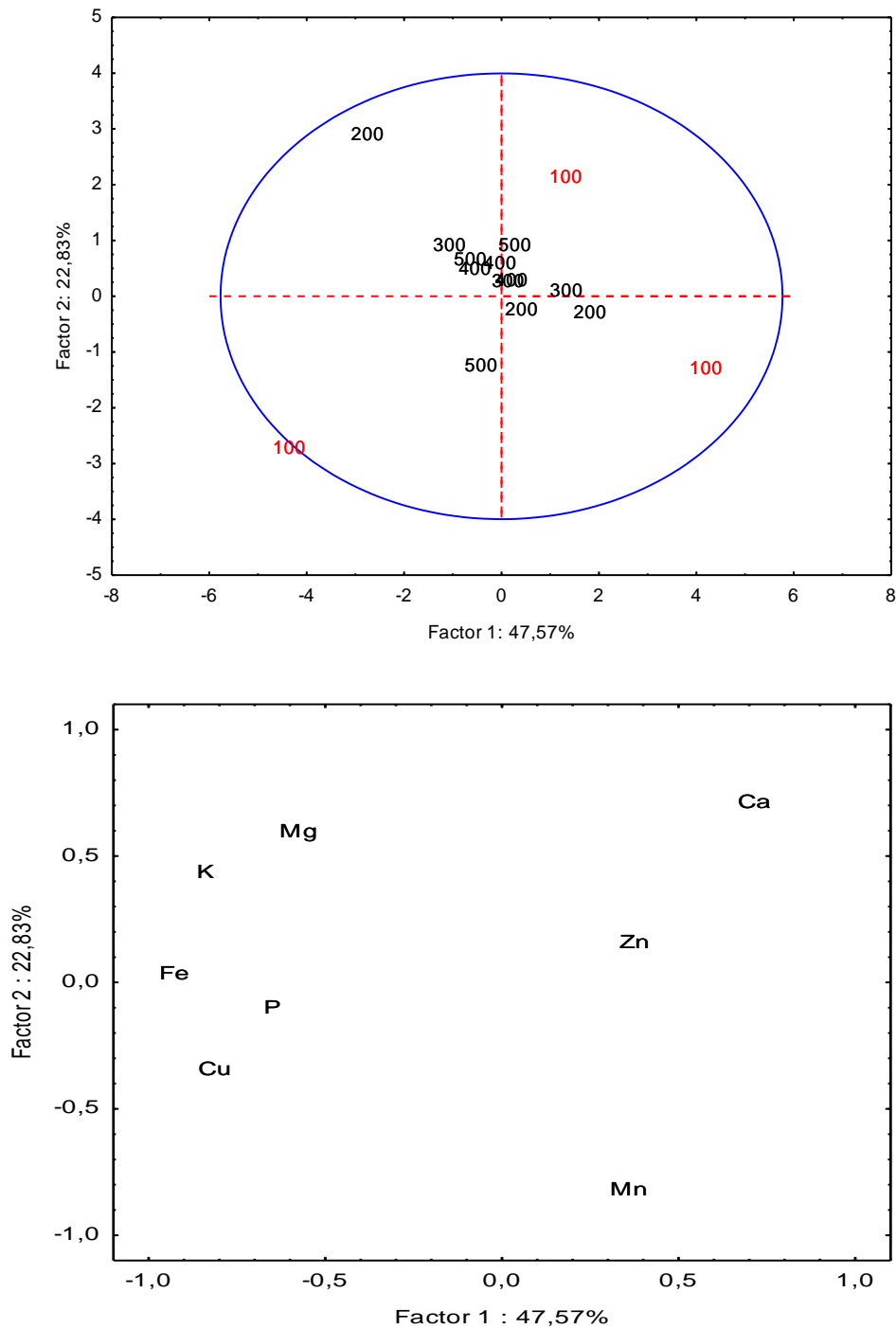
A partir dos resultados da ANOVA, foi possível observar que para valores de massa no intervalo de 100 a 500 mg os valores de F-calculado foram menores que os valores de F-crítico (**Tabela 3**), indicando não existir diferença significativa entre os resultados, comprovando haver homogeneidade entre as amostras [33]. No entanto para massas de 100 e 200 mg, ocorre um aumento do desvio padrão, podendo comprometer os resultados para massas inferiores a 300 mg.

Ao avaliar a massa mínima pela análise de componentes principais, é possível verificar que as duas primeiras componentes totalizam 70,4% da variância dos dados, de modo que o gráfico de pesos, **Figura 5 A)** e o gráfico de escores **Figura 5 B)** foram gerados para PC1 x PC2. No gráfico de pesos verifica-se que o ferro, na primeira componente principal, é a variável com maior poder de discriminação dos dados, por apresentar maior peso, negativo, seguido do potássio e do cobre. Com relação a PC2, o manganês e o cálcio são as variáveis que apresentam maiores pesos, negativos e positivos, respectivamente. Sendo esses os responsáveis pela dispersão observada para amostras com massas de 100 e 200 mg. Com relação às massas de 300, 400 e 500 mg, verifica-se a formação de um



grupo, confirmando homogeneidade do material para os analitos estudados. Desta forma a massa de 400 mg foi fixada para os estudos posteriores com o intuito de obter baixos desvios e assegurar a robustez do método.

**Figura 5.** Gráfico de pesos A) e Gráficos de Scores B) das duas primeiras componentes principais (PC1 x PC2) para estudo da massa mínima do candidato a material de referência de farinha de milho.



### 2.10.2.2 Estudo da Homogeneidade

Com intuito de avaliar a homogeneidade do candidato a MRL foi realizado o estudo de homogeneidade intra e inter frascos, por permitir obter informações sobre as variabilidades relativas a não homogeneidade do material embalado, seguindo as recomendações da ISO Guia 35: 2006. Os resultados obtidos estão contidos na **Tabela 17 e 18** (Apêndice).

A homogeneidade para os elementos Ca, K, Mg, P, Cu, Fe, Mn, Zn, e Mo foi avaliada com base na comparação das variâncias inter frascos. Os valores de F calculados para todos os elementos não excederam o valor crítico de 2,51 em nível de 5% (**Tabela 4**), comprovando que não existe diferença entre as variâncias sob as condições de 400 mg. Os coeficientes de variação (CV) para os testes de homogeneidade variaram de 1,7% a 6,5%.

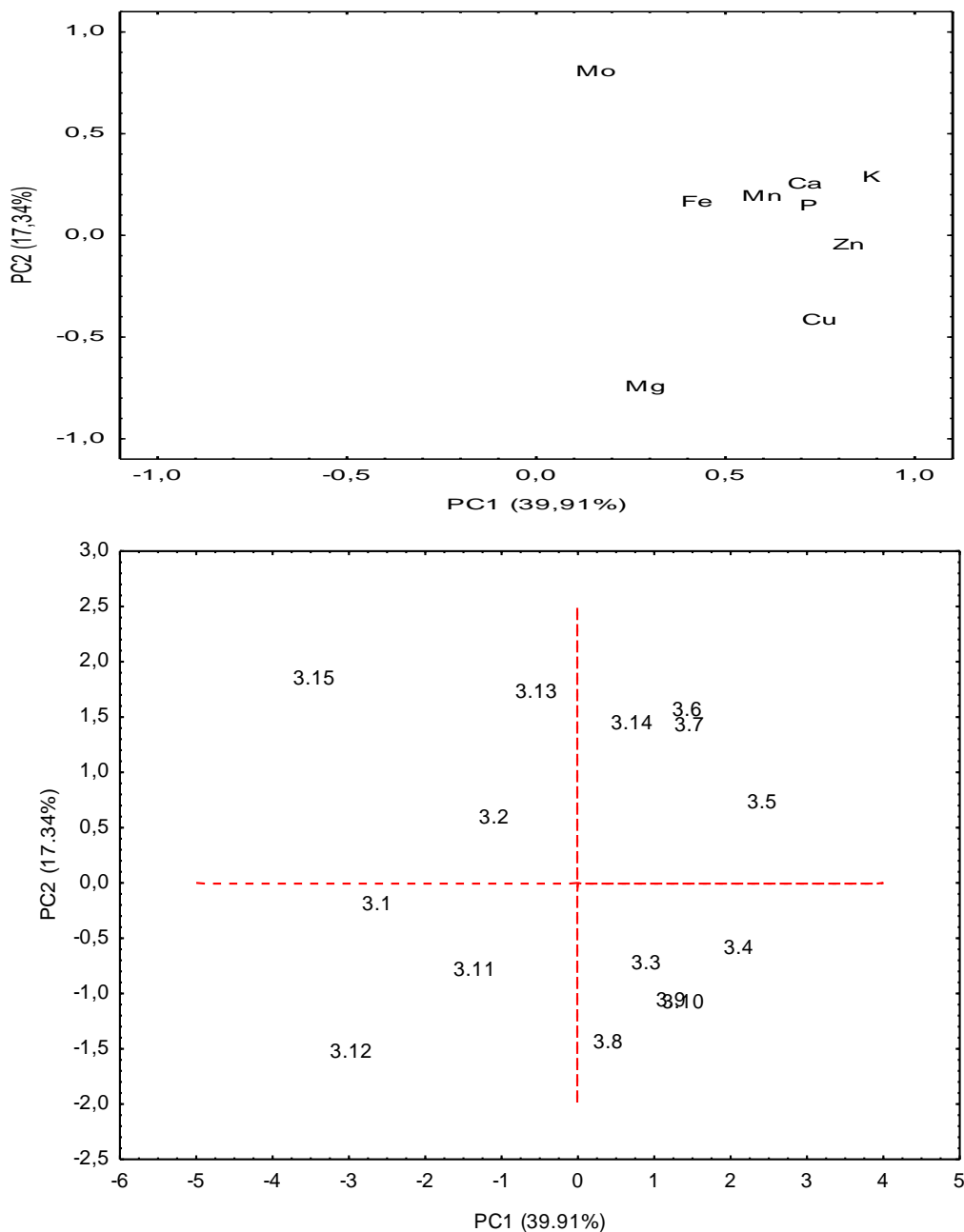
**Tabela 4.** Resultados da ANOVA para teste de homogeneidade intrer frascos utilizando uma massa de amostra de 400 mg.

Elemento	MS <sub>Within</sub>	MS <sub>Between</sub>	F <sub>cal</sub> *	p-value
Ca	3,38	2,29	0,68	0,70
K	2382	2998	1,26	0,32
Mg	142,5	98,5	0,69	0,69
P	728,2	458,4	0,63	0,74
Cu	0,0031	0,0051	1,64	0,18
Fe	0,155	0,212	1,37	0,27
Mn	0.00010	0,0012	1,25	0,33
Zn	0,0676	0,0836	1,24	0,33
Mo	0.00035	0,00026	0,73	0,66

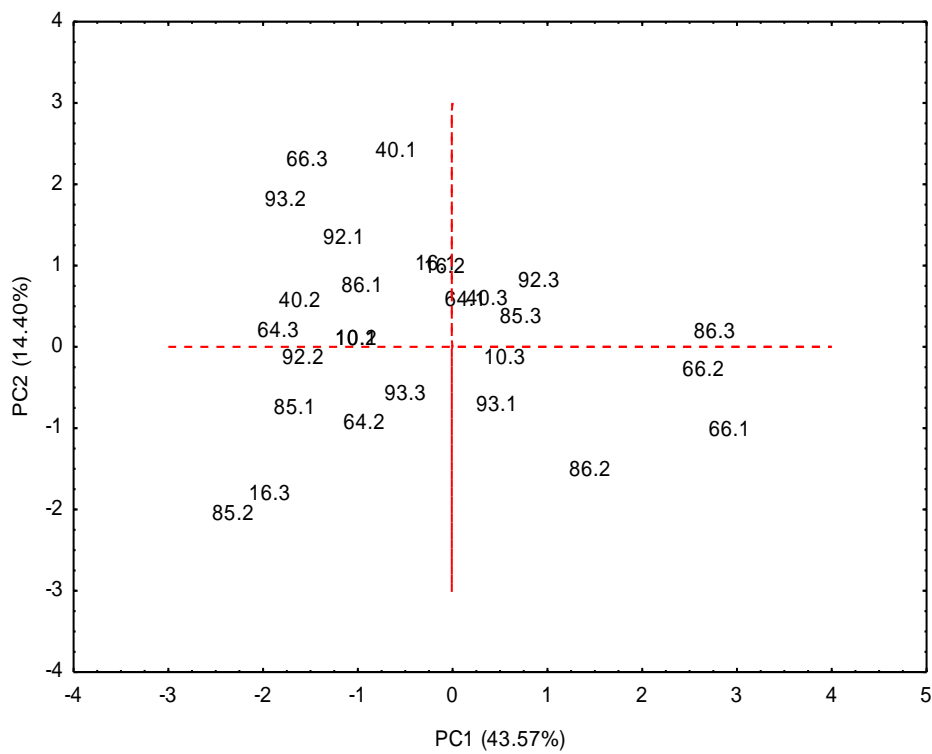
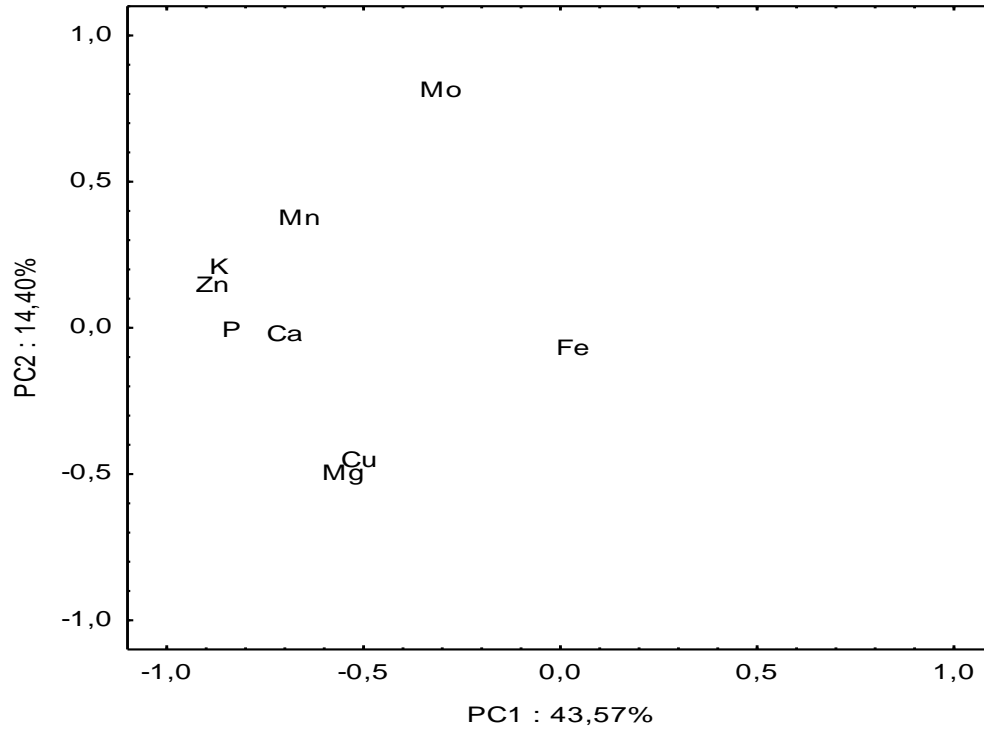
\*F<sub>crit</sub> = 2,51

De forma análoga ao estudo de massa mínima, a análise de componentes principais também foi aplicada aos dados de concentração para os estudos de homogeneidade intra e intrer frascos. A partir dessa análise foi possível obter os gráficos de escores e pesos (Figura 6 e 7). Para os dois gráficos, é possível verificar uma total aleatoriedade em termos de escores para as amostras no único grupo formado, indicando a homogeneidade do candidato a MR para os analitos determinados.

**Figura 6.** Gráficos pesos A) e Scores B) de PC1 xPC2 para o teste de homogeneidade intra recipientes utilizando uma massa de amostra de 400 mg.



**Figura 7.** Gráficos pesos A) e Scores B) de PC1 xPC2 para o teste de homogeneidade inter recipientes utilizando uma massa de amostra de 400 mg.



### 2.10.2.3 Incertezas inerentes à homogeneidade

Para avaliar o nível de incerteza relativa à homogeneidade foi aplicado o teste de Cochran [93], com o intuito de testar *outlier* devido à variação do método analítico em cada frasco, visando estabelecer a existência da diferença significativa entre eles.

Observando a **Tabela 4**, onde pode-se observar que  $F_{CAL}$  é menor  $F_{CRIT}$  existindo uma forte evidência, ao nível de confiança de 95 %, que, o candidato a MR é homogêneo. A incerteza devido à heterogeneidade ( $u_{bb}$ ) foi calculada usando a expressão dada na ISO Guia 35: 2006. A **Tabela 5** resume a incerteza devido à heterogeneidade decorrentes desses testes para todos os elementos. Com base nestes resultados, o material foi considerado homogêneo. A **Tabela 5** ilustra os valores de incerteza padrão ( $u_{bb}$ ) obtidos, referentes à homogeneidade do candidato a MR estudado, calculados usando-se a Equação 7 e 8 [61] para os elementos estudados.

**Tabela 5.** Incerteza padrão devido à falta de homogeneidade decorrente de testes intra e entre frascos para todos os elementos quantificados.

Elemento	Fração de massa (mg kg <sup>-1</sup> )	Incerteza padrão (mg kg <sup>-1</sup> )
Ca	27,51	0,24
Cu	0,55	0,01
Fe	8,07	0,05
K	1234	5
Mg	189,1	1,5
Mn	0,830	0,003
P	520,3	3,5
Zn	5,53	0,02
Mo	0,078	0,002

### 2.10.3 Estudo de estabilidade

A estabilidade foi estudada para condições de estocagem e armazenamento. As variações relativas ( $R_t$ ) obtidas e suas respectivas incertezas estão expostas na **Tabela 6**, e gráficos de regressão na **Figura 12** (Apêndice).

**Tabela 6.** Resultados do estudo de estabilidade após estocagem entre 0 e 15 meses.

Elemento	Tempo (mês)	$R_t \pm u_t$ (-10°C) <sup>a</sup>	$R_t \pm u_t$ (45°C) <sup>a</sup>	Elemento	Tempo (mês)	$R_t \pm u_t$ (-10°C) <sup>a</sup>	$R_t \pm u_t$ (45°C) <sup>a</sup>
Ca	0	0,99 ± 0,08	1,00 ± 0,11	Cu	0	0,97 ± 0,05	1,01 ± 0,04
	3	1,02 ± 0,05	1,01 ± 0,08		3	0,92 ± 0,08	1,01 ± 0,10
	6	0,99 ± 0,01	1,03 ± 0,06		6	0,87 ± 0,29	0,76 ± 0,25
	9	1,00 ± 0,02	0,98 ± 0,04		9	1,03 ± 0,07	0,99 ± 0,05
	12	1,04 ± 0,01	0,98 ± 0,01		12	0,91 ± 0,19	1,05 ± 0,18
	15	1,05 ± 0,01	0,99 ± 0,04		15	1,01 ± 0,03	1,07 ± 0,05
K	0	1,01 ± 0,04	1,03 ± 0,05	Fe	0	0,96 ± 0,06	1,03 ± 0,08
	3	0,98 ± 0,02	0,98 ± 0,04		3	1,00 ± 0,06	1,02 ± 0,12
	6	0,98 ± 0,05	0,95 ± 0,08		6	0,94 ± 0,16	0,95 ± 0,14
	9	1,03 ± 0,05	0,98 ± 0,001		9	1,04 ± 0,04	0,97 ± 0,05
	12	1,04 ± 0,02	1,08 ± 0,09		12	1,02 ± 0,21	1,00 ± 0,19
	15	1,04 ± 0,02	0,99 ± 0,01		15	0,93 ± 0,08	0,93 ± 0,10
Mg	0	0,99 ± 0,05	1,05 ± 0,09	Mn	0	0,98 ± 0,02	1,02 ± 0,12
	3	1,04 ± 0,01	1,03 ± 0,06		3	1,03 ± 0,03	1,03 ± 0,06
	6	0,97 ± 0,08	0,97 ± 0,03		6	0,97 ± 0,02	0,98 ± 0,06
	9	1,06 ± 0,06	0,96 ± 0,01		9	0,97 ± 0,09	0,96 ± 0,03
	12	1,03 ± 0,02	1,08 ± 0,06		12	1,05 ± 0,02	1,00 ± 0,02
	15	1,00 ± 0,01	0,95 ± 0,07		15	0,99 ± 0,03	1,00 ± 0,07
P	0	0,98 ± 0,07	1,03 ± 0,08	Zn	0	1,02 ± 0,07	1,03 ± 0,06
	3	0,96 ± 0,05	0,97 ± 0,04		3	1,00 ± 0,01	0,96 ± 0,05
	6	0,98 ± 0,01	0,98 ± 0,08		6	0,90 ± 0,02	0,99 ± 0,18
	9	1,06 ± 0,05	0,98 ± 0,02		9	1,02 ± 0,04	0,96 ± 0,03
	12	1,04 ± 0,03	0,99 ± 0,01		12	0,96 ± 0,13	0,92 ± 0,14
	15	0,99 ± 0,01	0,98 ± 0,02		15	1,02 ± 0,03	1,01 ± 0,04

<sup>a</sup> $R_t$  = Variação relativa;  $u_t$  = Incerteza.



#### 2.10.4 Caracterização do material

Após a recepção dos resultados dos laboratórios participantes da comparação interlaboratorial, um número de identificação foi estabelecido para cada laboratório. Os elementos químicos foram escolhidos para o material de referência, com base no maior número de resultados obtidos. A **Tabela 7** lista os métodos de decomposição e técnicas analíticas instrumentais usadas pelos colaboradores.

**Tabela 7.** Métodos de decomposição e técnicas instrumentais analíticas utilizadas pelos participantes da comparação interlaboratorial para candidato a material de referência de farinha de milho.

Lab ID	Preparo de amostra	Técnicas analíticas
Lab 1	0, 4 g /HNO <sub>3</sub> :H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Bloco digestor	ICP OES
Lab 2	0, 2 g /HNO <sub>3</sub> :H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /micro-ondas	FAAS
Lab 3	0, 4 g /HNO <sub>3</sub> :H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Bloco digestor	ICP OES
Lab 4	0,25g /HNO <sub>3</sub> :H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /micro-ondas	ICP OES
Lab 5	0, 5 g /HNO <sub>3</sub> :H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Bloco digestor	ICP OES
Lab 6	0,2 g	INAA
Lab 7	0, 4 g /HNO <sub>3</sub> :H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Bloco digestor	ICP OES
Lab 8	0, 2 g /HNO <sub>3</sub> :H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /micro-ondas	ICP OES
Lab 9	0, 2 g /HNO <sub>3</sub> :H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /micro-ondas	ICP OES
Lab 10	0,3 g /HNO <sub>3</sub> :H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /micro-ondas	FAAS
Lab 11	0, 4 g /HNO <sub>3</sub> :H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Bloco digestor	XRF
Lab 12	0,3 g /HNO <sub>3</sub> :H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /micro-ondas	ICP OES
Lab 13	0, 4 g /HNO <sub>3</sub> :H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Bloco digestor	ICP OES

Os testes de Grubbs e Cochran foram aplicados para um intervalo de 95% de confiança permitindo excluir os valores atípicos. Na **Tabela 8** estão os laboratórios



identificados, com as iniciais dos testes estatísticos que apresentaram os valores significativos.

**Tabela 8.** Avaliação estatística dos laboratórios que fizeram as determinações dos analitos

Elemento \ Lab	Lab							
	Ca	K	Mg	P	Cu	Fe	Mn	Zn
Lab 1	-	-	-	-	-	-	-	-
Lab 2	-	-	-	-	-	-	-	-
Lab 3	-	-	-	-	-	-	-	-
Lab 4	-	-	-	-	*G	-	-	-
Lab 5	*G;*C	-	-	*G;*C	-	-	-	*G
Lab 6	-	-	*G	-	-	-	*G	*G
Lab 7	-	-	-	-	-	-	-	-
Lab 8	-	-	-	-	-	-	-	-
Lab 9	-	-	-	-	-	-	-	-
Lab 10	-	-	-	-	*G	*G;*C	*G	-
Lab 11	-	*G;*C	-	-	*G	-	*G	-
Lab 12	-	-	-	-	-	-	-	-
Lab 13	-	-	-	-	-	-	-	-

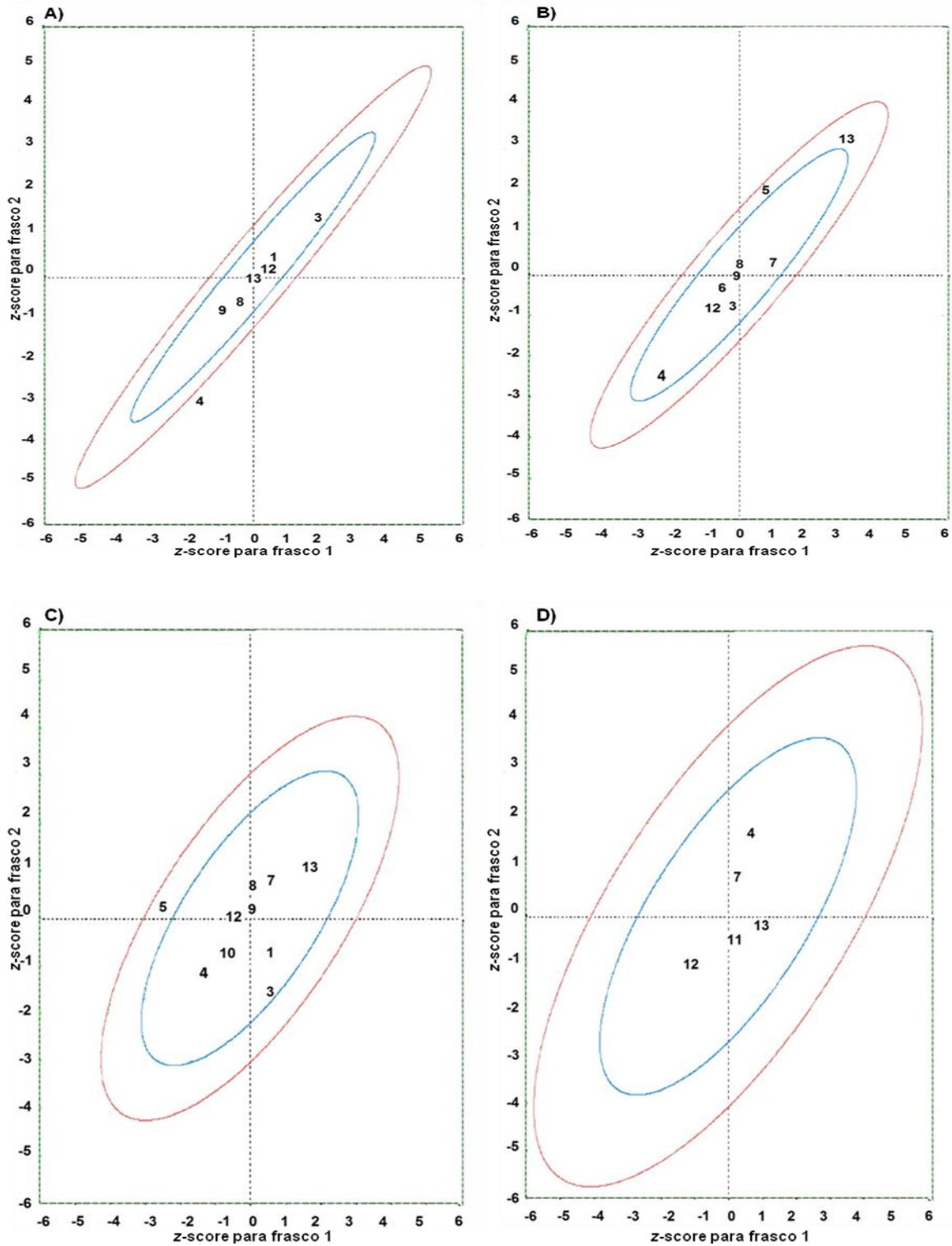
\*G-Grubbs; \*C-Cochran; \* Nível de confiança de 99%.

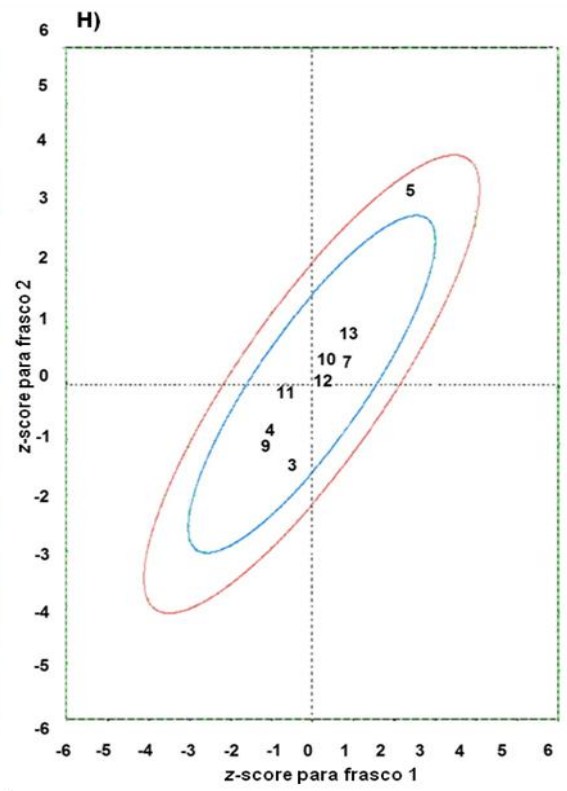
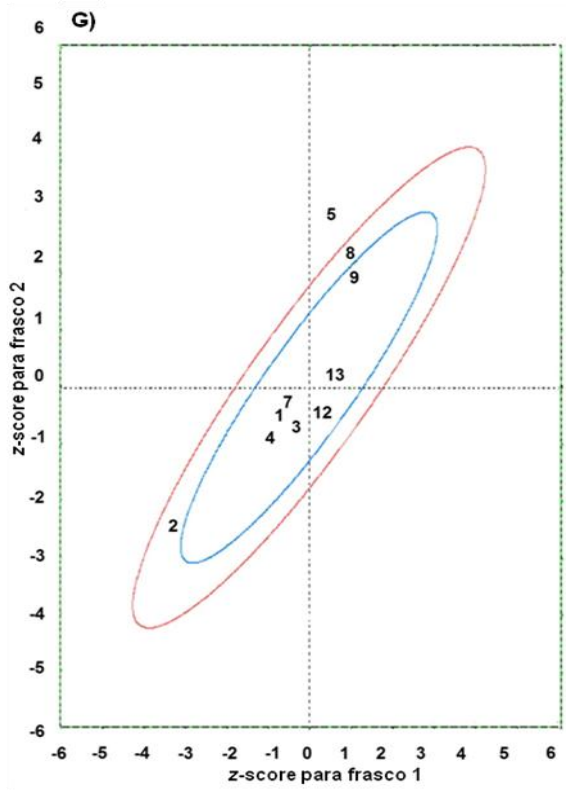
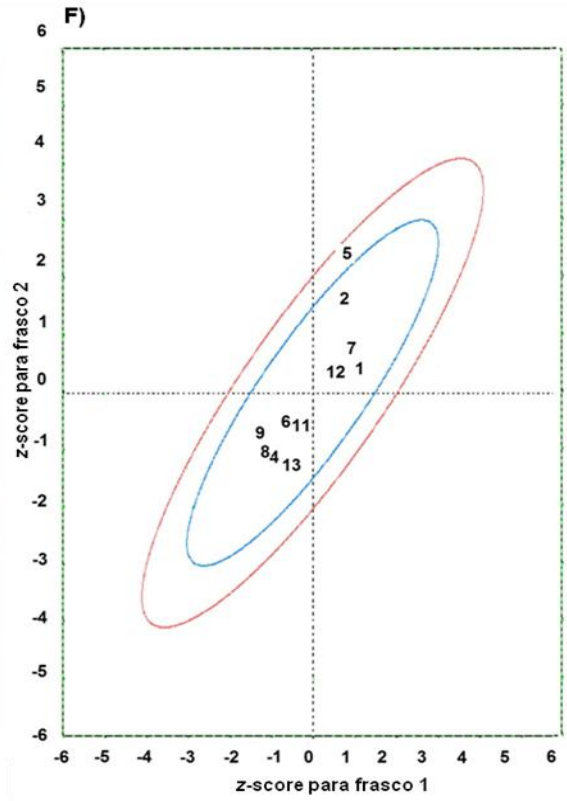
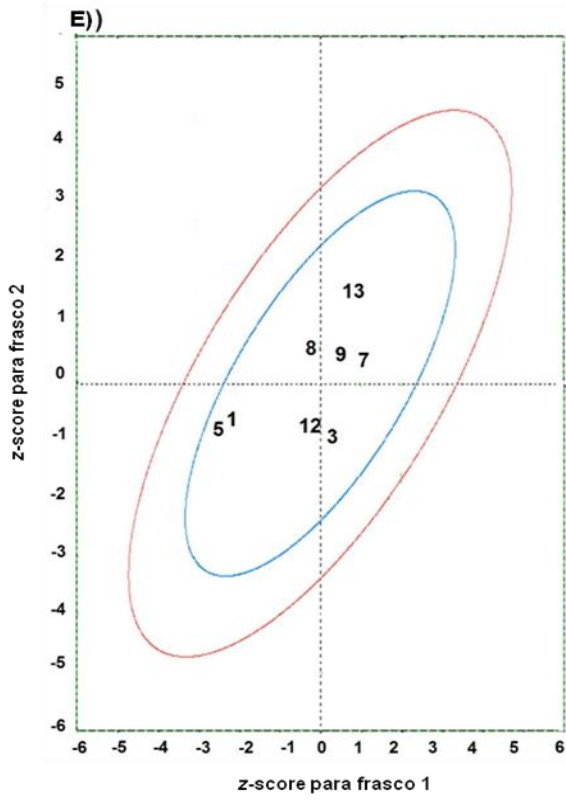
A compatibilidade entre os laboratórios foi verificada aplicando a técnica da elipse de confiança, que foram obtidas com os resultados de z-score fornecidos pelos laboratórios participantes, **Figura 9**, são retas que passam pelas médias dos laboratórios, em x e y dividem o diagrama em quadrantes, em que o seu ponto de intersecção é aceito como o valor mais provável [94]. Pontos encontrados nos quadrantes superiores direito e inferior esquerdo representam laboratórios que podem estar ocorrendo erros sistemáticos, ou seja, os laboratórios tendem a obter valores altos ou baixos, em ambas as amostras do par.

Os pontos afastados do eixo maior da elipse indicam erro aleatório significativo e podem ocorrer devido à variabilidade dentro do laboratório, podendo ser originada por um operador não devidamente treinado, ou erros ocasionais (erro de leitura, de cálculo, em conversão de valores, em transcrição de dados etc.). Assim para Mg, **Figura 9. C)**, o resultados do Lab 5, apresentaram-se na faixa em 99 e 55 % sendo considerado questionáveis, passível de erros aleatórios.

Contudo se estiverem próximos ao eixo maior da elipse indicam erros sistemáticos significativos e ocorrem devido a condições adversas do laboratório, podendo ter origem em modificações não permitidas na metodologia ou equipamentos não aferidos ou não calibrados. Deste modo para o K **Figura 9. B)**, Fe **Figura 9. F)**, Mn **Figura 9. G)** o Lab 5, apresentou resultados questionável e para Zn **Figura 9. H)** insatisfatório, todos indicando a presença de erro sistemático. Os Lab 2 e Lab 8, apresentaram resultados suspeitos para o Mn **Figura 9. G)**, indicando a presença de erro sistemático. Para o Ca **Figura 9. A)** os resultados do Lab 4, indicaram a presença de erros aleatórios e sistemáticos, fora da faixa de 99%, de modo que seu desempenho foi considerado insatisfatório.

**Figura 9.** Elipse de confiança com base em z-escores para frações de massa dos elementos A) Ca, B) K, C) Mg, D) P, E) Cu, F) Fe, G) Mn, H) Zn. As elipses incluem os intervalos de confiança de 95% e 99%; os números de identificação dos participantes





#### 2.10.4.1 Incerteza associada à caracterização do material

O valor da incerteza associada à caracterização do material foi obtido através da Equação 11, considerando os resultados apresentados pelos laboratórios participantes para 95 e 99% de confiança (**Tabela 9**).

**Tabela 9.** Incerteza padrão decorrente da caracterização do candidato a MR.

Elemento	Incerteza padrão	Incerteza padrão
	95%	99%
Ca	0,54	0,078
K	4,4	4,5
Mg	0,0006	0,0006
P	0,007	0,007
Cu	1,3	0,015
Fe	2,0	0,014
Mn	0,16	0,17
Zn	0,032	0,032

#### 2.10.5 Incerteza combinada

A incerteza associada combinada foi calculada através dos dados obtidos com a Equação 12, como recomendado pela ISO GUID 35:2006. A **Tabela 10** resume os valores de fração de massa obtidos, bem como a respectiva incerteza.

**Tabela 10.** Valores atribuídos aos elementos determinados no Material de Referência de Laboratório de Farinha de Milho.

Elemento	Fração de massa (mg kg <sup>-1</sup> )	Incerteza padrão (mg kg <sup>-1</sup> )
Ca	24,6	1,5
K	1307	10
Mg	184,2	1,7
P	527,1	11,1
Cu	0,61	0,24
Fe	6,31	0,49
Mn	0,91	0,10
Zn	4,93	0,17

## 2.11 Conclusões parciais

A homogeneidade de candidato material de referência farinha de milho para os elementos Ca, K, Mg, P, Zn, Cu, Fe, Mn e Mo foi confirmada por ANOVA, através do qual foi possível provar que não houve diferenças significativas nos frascos investigados em um nível de confiança de 95%. Além disso, o candidato a MR foi considerado homogêneo por análise de componentes principais, que demonstra ser uma excelente ferramenta para avaliar a homogeneidade de um material. Este fato evidencia que a PCA pode ser aplicada como um método estatístico alternativo a ANOVA para a avaliação de homogeneidade de candidato a materiais de referência.

O estudo realizado confirmou que o material de farinha de milho é estável durante 15 meses a temperaturas de -10°C, 25°C e 45°C. A análise de agrupamento hierárquico (HCA) mostrou ser aplicável como método alternativo em estudos de estabilidade para candidatos a RM. A avaliação multivariada dos dados mostrou ser uma ferramenta importante devido à sua simplicidade e praticidade.

A técnica de elipse de confiança permite uma melhor discriminação dos resultados e pode ser considerada uma ferramenta poderosa, pois permite identificar valores atípicos, além de fornecer informações sobre o tipo de erro (aleatória ou sistemática) que causou a dispersão do resultado. O candidato a MR proposto pode ser aplicado para demonstrar a confiabilidade resultados analíticos para a fração de massa de Ca, K, Mg, P, Cu, Fe, Mn e Zn, em amostras de farinha de cereais, podendo ainda ser usado para verificações de rotina, controle de qualidade e validação de métodos analíticos.

---

---

## **CAPÍTULO III**

**Determinação simultânea e direta de ferro e cobre em  
amostras de farinhas de cultivo orgânico e  
convencional**

---

---

### 3.1 Introdução

As farinhas de cereais são alimentos amplamente consumidos pela população brasileira. A fortificação de farinhas de trigo e milho tornou-se obrigatória devido aos altos índices de anemia na população brasileira, o que levou o Ministério da Saúde e a Anvisa a recomendar cerca de 4,2 mg de ferro para cada 100g do alimento, tanto para farinhas vendidas diretamente ao consumidor quanto as que serão utilizadas como matéria prima pelas indústrias [95]. A farinha de feijão branco é considerada pela ANVISA um novo ingrediente [96] e não se enquadra nesta resolução, necessitando ainda de maiores estudos. Por apresentar na sua composição a faseolamina [97], este alimento tem sido cada vez mais consumido pela população brasileira, por prometer favorecer o emagrecimento e a redução dos níveis de glicemia plasmática, no entanto o seu consumo em excesso leva a dificuldade de absorção de micronutriente tais como o ferro e cobre que são essenciais para os seres humanos, mas a sua presença excessiva no organismo pode também ser prejudicial para a saúde [98, 99]. Desta forma métodos analíticos que possibilitem quantificar os teores de ferro e cobre em amostras destes alimentos vêm sendo requerido.

Para se determinar as quantidades de ferro e cobre em amostras com matrizes complexas como as de alimentos, na maioria das vezes são necessárias etapas prévias de preparo de amostras antes da análise instrumental, a qual inclui processos de extração [100], dos elementos de interesse, ou ainda a decomposição total da amostra. De modo geral as técnicas de preparo da amostra são demoradas e requerem grandes quantidades de reagentes, que são caros, geraram resíduos perigosos, além da facilidade de contaminação das amostras [101].

Métodos analíticos que possibilitem análises simples e confiáveis, para o monitoramento de elementos essenciais e tóxicos vêm sendo desenvolvidos, com o intuito de aumentar a frequência analítica e possibilitar maior agilidade nas análises de rotina [100]. A espectrometria de absorção atômica com forno de grafite é uma técnica que apresenta, além de baixos limites de detecção e quantificação, uma elevada sensibilidade. Apesar de nesta técnica, as amostras serem frequentemente



introduzidas na forma de solução, o que requer uma etapa a mais na análise, GF AAS possibilita ainda a introdução da amostra de forma alternativa, tais como a análise direta de amostras sólidas (SS) [102], o que se torna uma vantagem interessante, por eliminar a etapa de preparo de amostra [103], além de elevada sensibilidade por nenhuma diluição da amostra ser necessária. A única desvantagem que tem sido citada dessa técnica é a imprecisão dos resultados, com os valores de RSD entre 10 e 20%, devido à falta de homogeneidade da maioria das amostras sólidas e a pequena massa de amostra empregue para a análise [104, 105].

A introdução de fonte contínua de alta resolução na espectrometria de absorção atômica (HR-CS AAS) ampliou ainda mais a aplicabilidade e as vantagens de GF AAS com a análise de amostras sólidas direta [105], por utilizar uma lâmpada de alta intensidade de arco curto de xenônio, permite a emissão contínua entre 190 nm e 900 nm. A alta resolução do monocromador duplo e um dispositivo de carga acoplado (CCD) proporciona uma resolução de ~ 2:00 por pixel no UV distante, além disso, o comprimento de onda pode ser selecionado rapidamente pelo sistema monocromador [106, 107, 108]. Todas essas características do instrumento são a favor da determinação dos elementos, comumente de forma sequencial.

No entanto a alta resolução do equipamento torna possível monitorar toda a região espectral em torno da linha analítica, permitindo que o analista selecione entre linhas principais ou secundárias dos elementos de interesse. As linhas secundárias embora apresentem menor sensibilidade, tem sido utilizada como uma ferramenta poderosa para determinação simultânea de alguns metais e metaloides [109], visto que linhas analíticas com intervalos na faixa de 0,4 a 2,0 nm conseguem atingir o detector, desta forma quando as concentrações dos analitos estão presentes na amostra de interesse em quantidades proporcionais torna-se possível a sua quantificação de forma simultânea. Outra possibilidade para conseguir a determinação simultânea, é durante o estudo da temperatura de pirólise e atomização, estabelecer um programa comum de temperatura que permite a determinação simultânea de todos os elementos, sem que seja observada perda grande nos sinal analítico [110, 111]. Neste contexto, o uso de linhas atômicas

menos sensíveis tem sido fundamental para o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação simultânea de dois ou mais elementos por HR-CS GF AAS [101, 110, 112].

## **3.2 Objetivos**

### **3.2.1 Objetivo geral**

O presente trabalho teve como objetivo aplicar um novo material de referência de farinha de milho para avaliar a exatidão do método analítico proposto.

### **3.2.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver um método analítico simples, rápido e robusto para determinação direta e simultânea de Cu e Fe em amostras de farinhas empregando análise direta de sólidos e detecção por HR-CS- GF AAS.
- Investigar a aplicabilidade de linhas secundárias em detecção por HR-CS- GF AAS.
- Avaliar o teor de Cu e Fe em amostras de farinhas de cultivo orgânico e convencional.
- Avaliar a exatidão do método proposto com um novo MR de farinha de milho.

### 3.3 Parte experimental

#### 3.3.1 Equipamentos e acessórios

Neste trabalho foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução e atomização eletrotérmica da (Analytik Jena AG, Jena, Alemanha), Modelo ContrAA700, equipado com uma lâmpada de arco curto de xenônio operando em modo “hot-spot” com fonte de radiação contínua e amostrador de sólidos modelo SS60. Foram utilizadas para a quantificação sequencial de Cu e Fe as linhas secundárias, localizadas em 217,894 e 217,812 nm respectivamente, um tempo de integração de 8 s com 5 pixels para Cu e 3 pixels para Fe foi usado para as medidas.

O programa de aquecimento em forno de grafite para a determinação simultânea de Cu e Fe é mostrado na **Tabela 11**, Todos os experimentos foram realizados usando tubos de grafite piroliticamente recobertos sem orifício de injeção (Analytik Jena, Parte N ° 407-A81.303). As amostras foram inseridas no tubo de grafite com o auxílio de plataformas de amostragem sólida - SS (Analytik Jena, Part No. 407-152,023). Uma microbalança M2P (Sartorius, Göttingen, Alemanha) foi utilizada para a pesagem das amostras diretamente nas plataformas de SS. As massas da amostra introduzidas foram utilizadas para calcular as absorvâncias integradas normalizadas (absorvâncias integrada calculada para 1 mg de amostra) para cada medida, visto que é difícil conseguir pesar sempre a mesma massa da amostra em análise SS direta. O acessório de amostragem sólido (Analytik Jena), o par de pinça pré-ajustada, que é parte do manual SSA 6 foi usada para transferir as plataformas SS para o atomizador. O gás Argônio, com um grau de pureza de 99,996% (White Martins, Bahia, Brasil), foi utilizado como gás de purga, com uma vazão de 2,0 L min<sup>-1</sup> durante todas as fases, exceto durante a atomização, quando o fluxo foi interrompido para a determinação dos elementos de interesse.

**Tabela 11.** Programa de temperatura para a determinação simultânea de Cu e Fe por análise direta de sólidos e HR-CS GF AAS.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s <sup>-1</sup> )	Tempo de permanência (s)	Tempo (s)	Fluxo de Ar (L min <sup>-1</sup> )
Secagem 1	90	5	20	32,0	2,0
Secagem 2	110	3	10	16,7	2,0
Pirólise	1400	100	20	32,9	2,0
Auto zero	1400	0	5	5,0	0
Atomização	2400	2500	5	5,4	0
Limpeza	2700	500	8	8,6	2,0

(Autor, 2016)

### 3.3.2 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. O ácido nítrico (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi utilizado na preparação de soluções de calibração aquosa, após purificação por destilação de sub-ebulição em quartzo (Kürner Analystechnik, Rosenheim, Alemanha).

Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultrapura, obtida a partir de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA), com resistividade específica de 18 MΩ cm.

Todos os recipientes e utensílios de vidro foram mantidos em ácido nítrico 1,4 mol L<sup>-1</sup> por pelo menos 24 h, e lavou-se três vezes com água deionizada antes da sua utilização.

As Soluções padrão de trabalho foram preparadas através de diluição da solução estoque. As Soluções Padrão de Cádmio e Ferro (1000 mg L<sup>-1</sup> foram preparadas com ácido nítrico 0,014 mol L<sup>-1</sup>)

### **3.3.3 Amostras reais e material de referência certificado**

As amostras de farinha de feijão branco, milho e trigo, de cultivo orgânico e convencional, investigadas, foram adquiridas em supermercados na cidade de Salvador, Bahia, Brasil. Como as amostras de farinha e os CRM estavam disponíveis como pó fino, os procedimentos de preparação da amostra (moagem e secagem), foram desnecessárias, antes da análise instrumental.

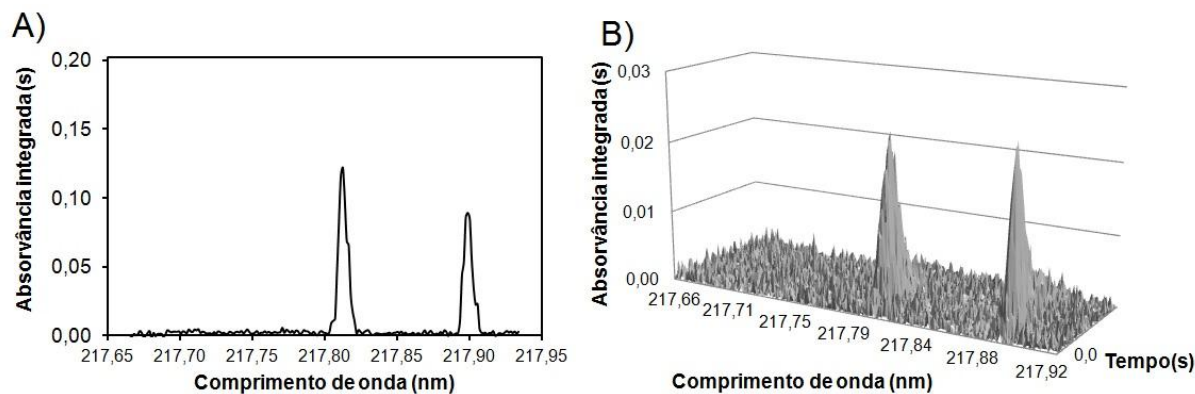
A massa da amostra pesada diretamente na plataforma do SS e introduzida no forno de grafite para SS-GF AAS, compreendeu uma faixa entre 0,1 mg e 1,5 mg. Todas as determinações foram realizadas em triplicata, e os sinais de absorvância integrados foram normalizados para uma amostra de massa de 1 mg. O mesmo procedimento foi utilizado para os materiais de referência certificado de farinha de arroz (NIST 1568a) e farinha de trigo (NIST 1567a).

### 3.4 Resultados e discussão

Apesar dos equipamentos de HR-CS AAS serem comumente utilizados para determinação sequencial de diversos elementos [101], trabalhos buscando a determinação simultânea tem sido propostos [113, 116, 104, 117], onde a utilização de linhas atômicas alternativas (primárias e secundárias) tem sido explorada.

Dentre as diversas linhas secundárias que o ferro possui [106], existe a linha 217,812 nm, que fica próxima a linha secundária 217,894 nm do cobre, como é mostrado na **Figura 10**. Estas duas linhas estão separadas em 0,082 nm e estão dentro do intervalo espectral compreendido pelo detector de CCD que é  $\pm 0,135$  nm em torno do comprimento de onda em 217,812 nm de modo que o monitoramento simultâneo de ambas as linhas torna-se possível. A linha secundária de ferro em 217,812 nm é oito vezes menos sensível do que a sua linha principal de 248,327 nm, enquanto que a linha secundária de cobre a 217,894 nm é cerca de cinco vezes menos sensível do que a sua linha principal, localizada em 324,754 nm. Neste caso, as sensibilidades das linhas secundárias estão de acordo com os níveis de concentração dos elementos investigados em amostras de farinha. Além disso, o software do HR-CS AAS permite também a seleção do número de pixel para cada elemento proporcionando um aumento ou diminuição da sensibilidade [109, 114]. Desta forma, 5 e 3 pixels foram usadas para o cobre e ferro, respectivamente, de modo a melhor se adequar a sensibilidade das linhas de acordo com os níveis de concentração dos elementos presentes nas amostras. Além disso, não foi observada nenhuma outra linha atômica ou banda molecular neste intervalo espectral. Assim, foi possível determinar o cobre e o ferro em amostras de farinha sem interferências espectrais.

**Figura 10.** Espectro de absorvância integrada na vizinhança da linha secundária de ferro em 217,812 nm para uma amostra de farinha de milho: A) sinal bidimensional e B) sinal tridimensional



### 3.4.1 Otimização das temperaturas de Pirólise e Atomização

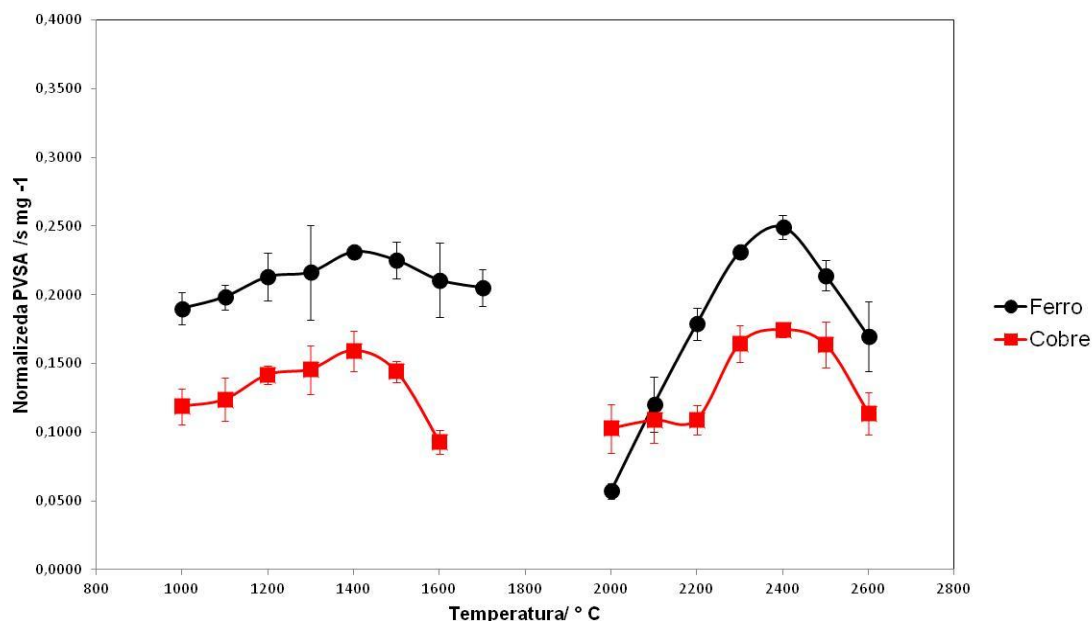
Um programa de temperatura que possibilite a determinação simultânea dos elementos de interesse é um dos requisitos para que a mesma seja possível. Desta forma as curvas de pirólise a atomização foram obtidas utilizando a amostra de farinha de milho, como mostra a **Figura 11**. As temperaturas de pirólise estudadas compreenderam uma faixa de 1000 a 1700 °C, enquanto a temperatura de atomização foi fixada em 2300°C. Neste estudo foi observada que na faixa compreendida entre 1200 a 1400 ouve um aumento do sinal da absorvância integrada, região onde foi possível eliminar grande parte da matriz na amostra. Apesar de cada metal apresentar um comportamento diferente, na temperatura de 1400°C foi possível observar uma maior absorvância integrada para ambos os analitos. Os estudos também foram realizados utilizando magnésio 0,1% (m/v) como modificador químico, com o intuito de avaliar o seu efeito sobre o comportamento térmico dos analitos na etapa de pirólise, mas nenhum efeito significativo foi observado. De acordo com a literatura [115-117] Cu e Fe são elementos termicamente estáveis e o uso de modificadores químicos podem ser geralmente desnecessários. Este fato pode ser explicado, provavelmente, porque não foi observada qualquer diferença significativa para o comportamento térmico de ambos os analitos na ausência e na presença de magnésio avaliado como um modificador



químico. Portanto, o uso de modificadores químicos não foi necessário para determinar Cu e Fe em amostras de farinha, proporcionando mais simplicidade e rapidez com o método proposto.

As curvas de atomização foram obtidas no intervalo de 2000 a 2600 °C, e a temperatura de pirólise foi fixada em 1400 °C. Na **Figura 11**, é possível observar que para os elementos estudados, ao aumentar a temperatura de atomização até 2400 °C houve um aumento significativo das absorvâncias integradas para o ferro e o cobre, no entanto, para temperaturas superiores a estas, a absorvância integrada diminuía. O perfil de pico mais definido foi obtido em temperaturas de atomização acima de 2200°C, sendo a temperatura de atomização de 2400°C escolhida para a atomização dos analitos em virtude dos sinais de absorvância mais elevadas e o perfil do pico mais estreito ter sido obtido para ambos os analitos. Sob esta condição térmica estabelecida, o tempo de vida do forno de grafite foi de cerca de 500 ciclos de aquecimento.

**Figura 11.** Efeito das temperaturas de pirólise e atomização na determinação direta e simultânea de cobre e de ferro por SS-HR-CS GF AAS para uma amostra de farinha de milho.



### 3.4.2 Figuras e mérito e calibração

Quando é utilizada amostragem direta de sólidos, o que pode ser considerado como desvantagem do método é o fato das curvas de calibração serem feitas com CRM, pois os processos de atomização e vaporização da substância a analisar, pode depender da forma em que o analito está presente na amostra sólida, sendo ainda afetada pela matriz sólida [105]. Assim, as figuras de mérito para o método proposto, **Tabela 12**, foram obtidas de forma simultânea utilizando o CRM de farinha de arroz NIST 1568a (massa de 0,086 a 0,322 mg), o que correspondeu a massas de analitos de 0,206-0,773 ng para Cu e 0,646-2,383 ng para Fe. Para a curva de calibração externa usando padrão aquosa, as massas de analito variaram de 0,200-0,700 ng para Cu e 0,600-2,100 ng para o Fe, através da injeção de diferentes volumes contendo 50,0 mgL<sup>-1</sup> de Cu e 150,0 mgL<sup>-1</sup> de Fe. As curvas de calibração foram obtidas com massas crescentes do CRM de farinha de arroz, bem como com padrões aquosos com o intuito de avaliar as inclinações obtidas. Desta forma, como apresentado na **Tabela 12**, as inclinações obtidas pelos métodos de calibração foram concordantes a 95% de confiança, sendo possível utilizar a técnica de calibração externa usando padrão aquoso para a calibração diminuindo o custo e o tempo das análises, além de estabilizar mais facilmente a temperatura da plataforma no forno [118].

**Tabela 12.** Figuras de mérito obtidos utilizando padrões de calibração sólidos e aquosos para a determinação direta e simultânea de Cu e Fe por SS-HR-CS GF AAS.

Parâmetros	Cu	Fe
Equação de regressão linear padrão aquoso	$y = (0,2777 \pm 0,0145)x + (0,0049 \pm 0,0336)$	$y = (0,0566 \pm 0,0015)x + (0,0008 \pm 0,0021)$
Equação de regressão linear (NIST 1568a)	$y = (0,2784 \pm 0,0181)x + (0,0105 \pm 0,0093)$	$y = (0,0563 \pm 0,0028)x + (0,0074 \pm 0,0044)$
R (padrão aquoso)	0,9978	0,9998
R (NIST 1568a)	0,9989	0,9996
LOD* (ng mg <sup>-1</sup> )	0,03	0,11
LOQ* (ng mg <sup>-1</sup> )	0,11	0,38
RSD (n=5)( %)	4,0 – 17,1	0,5 – 13,9

\*Valor calculado para massa de amostras de 1 mg.

A massa característica ( $m_0$ ), definida como a massa do analito que possibilita um PVSA de 0,0044 s [101], foi determinada neste trabalho como 14 pg de Cu e 77 para Fe, considerando as linhas secundárias utilizadas neste trabalho.

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados como três e dez vezes, respectivamente, o desvio padrão de dez vezes do branco (medições da plataforma SS vazia) dividido pela inclinação da curva de calibração aquosa. Ambos os limites foram calculados para a massa de 1mg. Todos os parâmetros analíticos deste nesse trabalho estão ilustrados na **Tabela 12**.

A exatidão do método foi confirmada por análise de três CRM: arroz 1568a farinha de NIST, farinha de trigo NIST 1567a e um novo MRL. Os valores encontrados usando o método proposto foram concordantes com os valores certificados, a um nível de confiança de 95%. Estes resultados estão resumidos na **Tabela 13**.

**Tabela 13.** Resultados obtidos na determinação simultânea de Cu e Fe em material de Referência Certificado por SS HR-CSGFAAS para n=4.

Amostras	Valor Certificado		SS HR-CS GFAAS	
	Cu (ng mg <sup>-1</sup> )	Fe (ng mg <sup>-1</sup> )	Cu (ng mg <sup>-1</sup> )	Fe (ng mg <sup>-1</sup> )
Farinha de arroz NIST 1568a	2,4 ± 0,3	7,4 ± 0,9	2,5 ± 0,1	7,9 ± 0,4
Farinha de Trigo NIST 1567a	2,1 ± 0,2	14,1 ± 0,5	2,1 ± 0,6	13,5 ± 2,0
Novo MR Farinha de milho	0,61 ± 0,2	6,3 ± 0,5	0,6 ± 0,2	6,4 ± 1,0

### 3.4.3 Análise de amostras reais

O método desenvolvido foi aplicado na determinação simultânea de ferro e cobre em amostras de farinha de feijão branco, farinha de milho, e farinha de arroz, ambas de cultivo orgânico e convencional. Os resultados foram obtidos utilizando padrões aquosos, três alíquotas de cada amostra, como massas variando entre 0,1 e 1,5 mg, foram introduzidas diretamente no forno de grafite (**Tabela 14**).

**Tabela 14.** Resultados da determinação direta e simultânea de ferro e cobre em amostras de farinha por SS-HR-CS GF AAS (n =3, a nível de confiança de 95%)

Amostra	Cu (mg kg <sup>-1</sup> )		Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	
	Valor encontrado	RSD (%)	Valor encontrado	RSD (%)
Trigo - orgânico 1	2,2 ± 0,1	3,3	20,6 ± 1,7	4,9
Trigo - orgânico 2	2,5 ± 0,3	8,1	9,3 ± 1,8	12
Trigo - convencional 1	2,4 ± 0,2	4,1	3,1 ± 0,3	7,2
Trigo - convencional 2	3,40 ± 0,04	0,7	21,8 ± 3,9	11
Milho - orgânico 1	1,6 ± 0,1	3,1	20,4 ± 5,2	15
Milho - orgânico 2	1,3 ± 0,1	3,1	14,9 ± 4,3	17
Milho - convencional 1	0,70 ± 0,08	8,2	3,2 ± 0,3	5,7
Milho - convencional 2	0,60 ± 0,07	6,1	2,6 ± 0,5	13
Feijão Branco- orgânico 1	5,9 ± 1,0	14	32,9 ± 10,1	13
Feijão Branco - orgânico 2	2,3 ± 0,2	4,9	34,4 ± 3,7	6,4
Feijão Branco - convencional 1	3,30 ± 0,03	0,5	50,4 ± 4,3	5,0
Feijão Branco - convencional 2	4,6 ± 0,2	2,5	21,8 ± 2,2	5,9

Os valores obtidos mostraram diferença significativa somente para as amostras de farinha de milho, em que as de cultivo orgânico os valores de ferro e cobre foram relativamente maiores que os de cobre, para as demais amostras a

forma de cultivo não mostram diferença significativas, foi possível inferir ainda que as amostras de feijão branco, apesar de não ser regulamentado pela ANVISA [95] o teor de ferro encontrado são maiores que os encontrados nos demais tipos farinhas. Além disso, as concentrações de ferro encontrados em todas as amostras analisadas não estavam de acordo com o valor recomendado pelo ANVISA para a suplementação de farinha com ferro, que é de 42 mg de ferro por 100 g de farinha [95], servindo de alerta para as agências regulamentadoras.

Neste trabalho o desvio-padrão relativo (RSD%) foi obtido a partir de cinco medições repetidas da amostra de farinha de milho. Os valores de RSD variaram entre 4% e 17% para Cu e entre 0.5 a 13.9% para Fe, valores aceitos para amostras sólidas [104]

#### **3.4.4 Comparação com métodos da literatura**

Uma comparação entre o método proposto com outros métodos descritos na literatura para a determinação simultânea de cobre e ferro foi realizada e apresentada na **Tabela 15**. De modo geral, todos estes métodos são baseados em procedimentos de preparação da amostra antes da análise instrumental, ao passo que o método proposto apresentou um baixo limite de quantificação para determinar simultaneamente os analitos sem qualquer tratamento de amostra.

**Tabela 15.** Comparação entre os métodos e outros propuseram método relatado na literatura para a determinação simultânea de Cu e Fe.

Técnica	Procedimento de preparo da amostra	Matriz	LOQ (mg kg <sup>-1</sup> )		Referência
			Cobre	Ferro	
ICP OES	digestão ácida em forno micro-ondas	Chá, grãos de trigo, e farinha de trigo	0,033	0,02	[119]
ICP OES	amostragem em suspensão	Farinha de trigo e alimentos prontos forno à base de farinha	1,50	1,58	[120]
ICP OES	digestão ácida na placa aquecida	Farinha de trigo	-	-	[85]
ICP OES	digestão ácida no bloco digestor	Farinha de milho	0,20	0,009	[84]
ICP OES	digestão ácida na placa aquecida	Farinha de trigo	-	-	[100]
SIMAAS e ICP OES	Extração e digestão ácida no forno micro-ondas	Castanhas de caju	-	-	[121]
SS-HR-CS GF AAS	sem tratamento da amostra	Milho, trigo e farinhas de feijão branco	0,11	0,38	Este trabalho

### **3.5 Conclusões parciais**

Neste trabalho, um método para determinação direta e simultânea para cobre e ferro com HR-CS GF AAS foi proposto. O uso de linhas secundárias permitiu a quantificação simultânea dos elementos analisados. Os parâmetros analíticos mostraram que o método proposto é uma ferramenta útil e interessante para a avaliação rápida dos teores de ferro e cobre em amostras de farinha. A exatidão do método foi confirmada com a utilização do novo MRL de farinha de milho. A aplicação do método proposto pode ser vantajosa para laboratórios de rotina em que necessita monitorar os teores de ferro e cobre em grande número de amostras, pois o tempo e os custos podem ser significativamente reduzidos. Finalmente, o método proposto é mais rápido, robusto e simples do que os métodos convencionais com base em procedimentos de digestão da amostra.

---

---

## **CAPÍTULO III**

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---

---



#### **4 Considerações finais**

A aplicação de PCA e HCA para avaliação de homogeneidade e estabilidade de candidato a MR é uma estratégia que permite uma visualização rápida e simples dos resultados gerados. Além de no estudo da massa mínima permitir extrair maior quantidade de informação que a ANOVA.

O procedimento estabelecido neste trabalho para preparação do MR de Farinha de Milho foi satisfatório para os ensaios necessários na caracterização do MR.

A participação dos laboratórios voluntários no ensaio interlaboratorial foi de fundamental importância para a obtenção dos valores designados para os analitos estudados.

O desenvolvimento de metodologias analíticas utilizando análise direta de amostras sólidas e HR-CS AAS permitiu obter procedimento simples, rápido, confiável, pouco dispendioso e com boa exatidão para análise de farinhas.

A calibração com padrões aquosos mostrou-se adequada a todos o procedimento proposto. O método desenvolvido não fez uso de modificadores, eliminando uma etapa da análise, reduzindo custos e tempo, o que pode ser considerado uma vantagem.

A utilização de linhas secundárias foi aplicada sem comprometer os sinais analíticos dos elementos em estudados representando um importante avanço na frequência analítica, especialmente em procedimentos envolvendo GF AAS.

Esse trabalho possibilitou o desenvolvimento de um Material de Referência de Farinha de Milho para Ca, K, Mg, P, Cu, Fe, Mn e Zn que poderá ser aplicado para o controle de resultados analíticos.

## 5 Referências

- [1] SANTOS, A. M. P., **Preparação e Certificação de um Material de Referência Botânico**, Tese (Doutorado), Universidade Federal da Bahia, (2005).
- [2] CARDOSO, M. H. W. M. C., **Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros**, Tese (Doutorado).
- [3] ISO GUIDE 30. Reference materials – Guide to the expression of uncertainty in measurement. **ISO**, (1999).
- [4] ISO GUIDE 35. Reference materials – General and statistical principles for certification. **ISO**, p.63, (2006).
- [5] ALVES, N.P.; *et al.*, Metrologia química e a utilização e materiais de referência em medições químicas. **Analytica**, v.3, p. 54, (2003).
- [6] ISO GUIDE 33. Utilização de matérias de referência certificados **ABNT**, p.28, (2002).
- [7] [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8\\_04.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf), acesso em 20 de abril de 2015.
- [8] KUCERA. J *et al.*, Preparation of the bovine kidney and bovine muscle reference materials and the certification of element contents from interlaboratory comparisons. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 352 , p. 66-72, (1995).
- [9] GONÇALVES, R. A.*et al.*, Rendimento e composição química de cultivares de milho em moagem a seco e produção de grits. **Ciência e Agrotecnologia**, v .27, p.643- 650, (2003).
- [10] SCHWANZ T.G.,*et al.*, Determination of polychlorinated biphenyls in corn by solid phase extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. **Química Nova**, v. 35, p. 553-558, (2012)

- [11] ALVIM, I. D.*et al.*, Desenvolvimento de farinhas mistas extrusadas à base de farinha de milho, derivados de levedura e caseína. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 170-176, (2002).
- [12] OLIVEIRA, F. A. M. O.*et al.*, Padrões alimentares em mudança: a cozinha italiana no interior paulista. **Revista Brasileira História**, v. 26, n. 51, p. 47-62, (2006).
- [13] Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO 4ª edição revisada e ampliada, (2011), disponível em <http://www.unicamp.br/nepa/taco/>
- [14] SILVA, M. R.*et al.*, Composição química de pratos à base de milho: comparação entre dados laboratoriais e de tabelas. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.63, n.2, p.193- 199, (2004).
- [15] Resolução CNPA, [www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/12\\_78.htm](http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/12_78.htm), acesso em 23 de abril de 2015.
- [16]<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Publicacao+Alimentos/Farinha+de+Milho>, acesso em 23 de abril de 2015
- [17] ROSSBACH, M.; GROBECKER, K. H. Homogeneity studies of reference materials by solid sampling - AAS and INAA. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 4, n. 12, p. 498-503.
- [18] CHUI, Q. S. H.*et al.*, Material de Referência Certificado – Utilização das técnicas de INAA e ICP OES em teste de homogeneidade em silício metálico, **ENQUALAB**, v.1, p. 242-247, (2003).
- [19] CHUI, Q. S. H.,*et al.*, O papel dos programas interlaboratoriais para a qualidade dos resultados analíticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 993-1003, (2004).
- [20] KATO, L. S.,*et al.*, Instrumental neutron activation analysis for assessing homogeneity of a whole rice candidate reference material. **J Radioanal Nucl Chem**, v. 297, p271–275, (2013).

- [21] SANTANA, L. V., **Preparo, caracterização e uso de um material de referência para ensaios de proeficiencia para a determinação de metais em tecido de peixe.** Dissertação (Mestrado), Instituto de Pesquisas Energeticas e Nucleares (IPEN), (2013).
- [22] NAGARAJA, K. V., Reference materials for food analysis Laboratories in India. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 352, p. 33-34, (1995).
- [23] <http://www.nist.gov/sm>, acesso em 02 de maio de 2015.
- [24] US Department of Agriculture, Agricultural Research Service (2006) USDA National Nutrient Database for Standard Reference, release 19. Disponível em: <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8964>
- [25] PHILLIPS, K. M., *et al.*, The role of quality control and reference materials in the National Food and Nutrient Analysis Program. **Anal Bioanal Chem** v. 384, p. 1341–1355, (2006).
- [26] HAYTOWITZ, D. B.; *et al* The identification of Key Foods for food composition research. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, n. 2, p. 183-194, (2002).
- [27] HAYTOWITZ, D. B. Setting priorities for nutrient analysis in diverse populations. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 13, p. 425–433, (2000).
- [28] <http://www.comar.bam.de>, acesso em 20 de abril de 2015
- [29] BECKER, D. A. Reflections on 35 years of biological SRM production and analyses. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 269, n. 2, p. 365-369, (2006).
- [30] Home page do CETEM, <http://www.cetem.gov.br/pdi/programas-e-projetos/em-curso/pmrc#nossos>, acesso em 20 de abril de 2015.

- [31] PHILLIPS, K. M., Summary of reference materials for the determination of the nutrient composition of foods. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 12, p. 126–133, (2007).
- [32] [http:// www.anvisa.com.br](http://www.anvisa.com.br), acesso em 02 de maio de 2015.
- [33] MOREIRA, G. E., **Preparo e caracterização de um material de referência de mexilhão** Perna (Linnaeus, 1758), Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, (2011).
- [34] ISO GUIDE 31. Materiais de referência – Conteúdos de certificados e rótulos. **ABNT**, p.8, (2004).
- [35] ISO GUIDE 32. Calibração em química analítica e uso de materiais de referência certificado. **ABNT**, p.7, (2000).
- [36] ISO GUIDE 34. Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. **ABNT**, p.25, (2004).
- [37] ANDREWS, L. S., *et al*, Food preservation using ionizing radiation. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, v.154, p.1-53, (1998).
- [38] Resolução - RDC nº 21, De 26 de janeiro de 2001, disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/>
- [39] SANTOS, A. F.; Determinação da dose de radiação gama para reduzir a população de Salmonella spp em carne de frango, **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.23 no.2, (2003).
- [40] DIEHL, J. F. Biological Effects of Ionizing Radiation in Safety of Irradiated Foods, **Safety of Irradiated Foods**. New York: Marcel Dekker, Inc, p. 345, (1990).
- [41] [http://www.cdtm.br/Pesquisa2/Laboratorios/Irradiacao\\_Gama-Fotos](http://www.cdtm.br/Pesquisa2/Laboratorios/Irradiacao_Gama-Fotos), acesso em 20 de abril de 2015.
- [42] Disponível em: <https://www.ipen.br/sitio/index.php?idc=238>> Acessado em 02 de fevereiro de 2015.

- [43] FREITAS, V. H. S., **A importância da irradiação para conservação dos alimentos**. Monografia (título de Tecnólogo em Radiologia), Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, (2007).
- [44] KRAMER, K. J. M.; *et al.*, Practical manual for the production of laboratory reference materials, Bergen, **Netherlands: Mermayde**, (2001).
- [45] MARKERT, B. Sample preparation (cleaning, drying, homogenization) for trace element analysis in plant matrices. **Science of the Total Environment**, v. 176, n. 1-3, p. 45-61
- [46] QUEVAUVILLER, P. Conclusions of the workshop - Improvements of trace element determinations in plant matrices. **Science of the Total Environment**, v. 176, n. 1-3, p. 141-148
- [47] PAULA, L. F.; *et al.*, Diretrizes para a construção de um moinho de bolas para a moagem de sólidos em laboratórios. **Química Nova**, Vol. 37, n. 4, p.736-739, (2014).
- [48] FAJGELJ, A.; ZEISLER, R. Particle size determination of some IAEA and NIST environmental and biological reference materials. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 360, n. 3-4, p. 442-445
- [49] ZEISLER, R.; *et al.*, Certifying the composition of a biological material- a case study. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v.352 p.111-115, (1995).
- [50] DYBCYŃSKI, R.; *et al.*, Some difficult problems still existing in the preparation and certification of CRMs. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v.370, p.126-130, (2001).
- [51] RODRIGUES, E. O., **Elaboração de material de referência in house para vacina contra Hib e produtos intermediários. Uma proposta para normalização de testes físico-químicos do controle de qualidade**. Dissertação (Mestrado), Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), (2009).

- [52] Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência, **Associação Brasileira de Normas Técnicas ISO Guide 34**, Rio de Janeiro, p. 25, (2004).
- [53] DYBCYŃSKI, R.; *et al.*, Tobacco leaves (CTA-VTL-2) new Polish CRM for inorganic trace analysis including microanalysis. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v.360, p.384-38, (1998).
- [54] COQUERY, M.; *et al.*, Certification of trace and major elements and methylmercury concentrations in a macroalgae (*Fucus sp.*) reference material, IAEA-140. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v.366, p.792-801, (2000).
- [55] KORHAMMER, S.; MARKERT, B. Certification of a new cabbage reference material for the quality control of trace-element determinations with some considerations on moisture (vol 21, pg 746, 2002). **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 2, p. VI-VI,
- [56] LLAURADÓ, M. *et al.*, Preparation of a soil reference material for the determination of radionuclides. **Analytica Chimica Acta**, v. 445, p. 99–106, (2001).
- [57] EURACHEM/CITAC. Quantificação das incertezas de medição analíticas. P.34, (2001).
- [58] ISO/IEC 98-3 (2008), Evaluation of measurement data - guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM). International Organization for Standardization, JCGM-100:2008
- [59] QUEVAUVILLER. P.; *et al.*, Certified reference materials for the quality control of trace elements in plants: white clover (CRM 402). **Analytica Chimica Acta**, v.359, p.281-288, (1992).
- [60] PUWASTIEN, P., *et al.*, Development of rice reference material and its use for evaluation of analytical performance of food analysis laboratories. **Journal of Food Composition and Analysis** v. 22, p. 453–462, (2009).

- [61] YAFSA, C.; *et al.*, New reference material for analysis of elements in glutinous rice produced at the National Institute of Metrology (Thailand). **Accreditation and Quality Assurance**. V. 15, p. 223–231. (2010).
- [62] COSTA, J. G.; ROCHA, G. M. da. Organização e avaliação de comparações interlaboratoriais. Xerém, Duque de Caxias, RJ: **Inmetro**, 5 p. 2005.
- [63] ISO/IEC, ISO/IEC 17025: general requirements for the competence of testing and calibration laboratories, ISO, Geneva, (2005).
- [64] NANNINI, D., *et al.* Model proficiency testing scheme for serological diagnosis of brucellosis: Interlaboratory study. **Journal of Aoac International**, 87(4), 965-971, (2004).
- [65] ANDRADE, D. F. DE; *et al.*, Comparação interlaboratorial para análise de dureza total e cloreto em água. **Química Nova**, V. 33, N. 8, p. 1784-1789, (2010).
- [66] LEE, K. J. *et al.* Development of new reference materials for the determination of cadmium, chromium, mercury and lead in polycarbonate. **Analytica Chimica Acta**, v. 758, p. 19-27, (2013).
- [67] SAMCZYŃSKI, *et al.*, Two New Reference Materials Based on Tobacco Leaves: Certification for over a Dozen of Toxic and Essential Elements, **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 16, (2012).
- [68] FEINBERG, M., Basics of interlaboratory studies: the trends in the new ISO 5725 standart edition. **Trends in Analytical chemistry**, v.14, p.450-457, (1995).
- [69] ANDRADE, D. F., Comparação interlaboratorial para análise de dureza total e cloreto em água, **Química Nova**, v. 33, No. 8, p. 1784-1789, (2010).
- [70] Guide to NATA proficiency testing. National Association of Testing Authorities. Australia ACN 004 379 748 2004.



- [71] KRASHENININA, M., *et al.*, Development of a certified reference material for the mass concentration of active chlorine in water and its application for an interlaboratory comparison, **Accreditation and Quality Assurance**, v. 20, p. 171-178, (2015).
- [72] OLIVIERI J. C., Método Gráfico para a Interpretação de Resultados em Programas Interlaboratoriais - Elipse de Confiança, **Publicação IPT no 1759** (1988).
- [73] YOUTEN, W.J., Grafical Diagnosis of Interlaboratorial Testes, **Industrial Quality Control**, p. 24-28, (1959).
- [74] MINGOTI, S. A., **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada**, Editora UFMG, ( 2005).
- [75] Ferreira, S. L. C, **Introdução as Técnicas de Planejamento de Experimentos**, Editora vento lestes, (2015).
- [76] BRUNS, R. E., *et al.* Quimiometria. **Química Nova**, v.8, p.84-99, (1985).
- [77] CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Non-supervised pattern recognition methods: Exploring chemometrical procedures for evaluating analytical data. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 481-487, (2007).
- [78] MORRISON, D.F., **Multivariate statistical methods** (2a ed.). New York, Mc Graw-Hill, 415 p. (1976).
- [79] NETO, J. M. M.; MOITA, G. C. An introduction analysis exploratory multivariate date. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 467-469, (1998).
- [80] BOROUCHE, J. M., *et al.*, **Análise de dados**. Zahar Editores. Rio de Janeiro, p. 116 , (1982).
- [81] LIMA, D. C. *et al.*, Principal component analysis and hierarchical cluster analysis for homogeneity evaluation during the preparation of a wheat flour laboratory reference material for inorganic analysis, **Microchemical Journal**, v. 95, p. 222–226, (2010).

- [82] ROCHA, Q. F. C., Uso de análise estatística multivariada para avaliar os resultados experimentais para a certificação de dois materiais de referência farmacêutica, **Accreditation and Quality Assurance**, v. 16, p. 523-528, (2011).
- [83] SHAKHASHIRO, A. *et al.* New certified reference materials and proficiency test for environmental radioactivity measurements. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 21, n. 5, p. 351-360, (2016).
- [84] DOS SANTOS, A. M. P.*et al.* Homogeneity study of a corn flour laboratory reference material candidate for inorganic analysis. **Food Chemistry**, v. 178, p. 287-291, (2015).
- [85] SAREMBAUD, J.*et al.* Application of the ANOVA-PCA method to stability studies of reference materials. **Analytica Chimica Acta**, v. 603, n. 2, p. 147-154, (2007).
- [86] RAGNO, G.; DE LUCA, M.; IOELE, G. An application of cluster analysis and multivariate classification methods to spring water monitoring data. **Microchemical Journal**, v. 87, n. 2, p. 119-127, Dec 2007.
- [87] JAKOPIC, R.*et al.* Results of the REIMEP-17 interlaboratory comparison for the measurement of the U and Pu amount content and isotope amount ratios in the synthetic dissolved spent nuclear fuel solution. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 20, n. 5, p. 421-429, (2015).
- [88] ISO 13528, Statistical methods for use in proficiency testing by Interlaboratory Comparisons. **ISO**, Geneva. (2015).
- [89] LabWin - Software para Laboratórios, <http://www.labwin.com.br>
- [90] OLIVIERI J. C., Método Gráfico para a Interpretação de Resultados em Programas Interlaboratoriais - Elipse de Confiança, **Publicação IPT no 1759** (1988).
- [91] EURACHEM/CITA. Quantificação das incertezas das medições analíticas, p. 34, 2001.

- [92] MENDES, A. S. R. Implementação e validação de métodos analíticos. Disponível em <http://www3.uma.pt/valimed/livro%202004/artigo6-AR.pdf> (Acessado em 30 de setembro de 2012.)
- [93] VERHALEN, T. R., **Preparação de um material de referência de solo para nutrientes e contaminantes inorgânicos**, Dissertação (Mestrado). (2014).
- [94] VANDER HEYDEN, Y.; SMEYERS-VERBEKE, J. Set-up and evaluation of interlaboratory studies. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1-2, p. 158-167, (2007).
- [95] Resolução n. 344. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Brasil, (2002).
- [96] Resolução n. 16. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Brasil, (1999).
- [97] BIRKETVEDT, G. B. (2005), Composition for treating obesity comprising extract from white kidney beans, red kidney beans, and green tea leaves, US 7579027 B2
- [98] LARA, P. C. P.*et al.* Use of Multivariate Optimization to Develop Methods for Direct Copper and Lead Determination in Breast Milk by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 4, p. 790-797, (2014).
- [99] FARAHANI, M. D.*et al.* Ionic Liquid as a Ferrofluid Carrier for Dispersive Solid Phase Extraction of Copper from Food Samples. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 8, p. 1979-1989, (2015).
- [100] ARAUJO, R. G. O.*et al.* Mineral composition of wheat flour consumed in Brazilian cities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 5, p. 935-942, (2008).
- [101] DITTERT, I. M.*et al.* Direct and simultaneous determination of Cr and Fe in crude oil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, v. 64, n. 6, p. 537-543, (2009).

- [102] DUARTE, A. T.*et al.* Determination of cadmium and lead in plastic material from waste electronic equipment using solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. **96**, n. **1**, p. **102-107**, (2010).
- [103] NOMURA, C. S.; DA SILVA, C. S.; OLIVEIRA, P. V. Solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry: A review. **Quimica Nova**, v. 31, n. 1, p. 104-113, (2008).
- [104] WELZ, B.*et al.* Progress in direct solid sampling analysis using line source and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 7-8, p. 2085-2095, (2007).
- [105] BELARRA, M. A.*et al.* Direct solid sampling with electrothermal vaporization/atomization: what for and how? **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 828-839, (2002).
- [106] WELZ, B.*et al.* High-resolution continuum-source atomic absorption spectrometry - What can we expect? **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 220-229, (2003).
- [107] ARAUJO, R. G. O.*et al.* Correction of structured molecular background by means of high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry-Determination of antimony in sediment reference materials using direct solid sampling. **Talanta**, v. 80, n. 2, p. 846-852, (2009).
- [108] DITTER, I. M.*et al.* Determination of silver in geological samples using high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry and direct solid sampling. **Microchimica Acta**, v. **167**, n. **1-2**, p. **21-26**, (2009).
- [109] RESANO, M.; VANHAECKE, F.; DE LOOS-VOLLEBREGT, M. T. C. Electrothermal vaporization for sample introduction in atomic absorption, atomic emission and plasma mass spectrometry-a critical review with focus on solid sampling and slurry analysis. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 23, n. 11, p. 1450-1475, (2008).

- [110] RESANO, M.*et al.* On the possibilities of high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple atomic lines. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 66, n. 5, p. 321-328, (2011).
- [111] OLIVEIRA, A. P.*et al.* Use of the internal standardization for difficult sampling by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 64, n. 2, p. 334-337, (2004).
- [112] VIGNOLA, F.*et al.* Simultaneous determination of Cd and Fe in sewage sludge by high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry with slurry sampling. **Microchemical Journal**, v. 95, n. 2, p. 333-336, (2010).
- [113] GOMEZ-NIETO, B.*et al.* Simultaneous and direct determination of iron and nickel in biological solid samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 116, p. 860-865, (2013).
- [114] RESANO, M.; FLOREZ, M. R.; GARCIA-RUIZ, E. High-resolution continuum source atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple lines. A critical review of current possibilities. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy**, v. 88, p. 85-97, (2013).
- [115] WELZ B.,; SPERLING, M. **Atomic absorption spectrometry**. Wiley-VCH, Weinheim, (1999).
- [116] SOUZA, S. D. O.*et al.* Determination of copper and mercury in phosphate fertilizers employing direct solid sampling analysis and high resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 114, p. 58-64, (2015).
- [117] DOS SANTOS, L. M. G.*et al.* Simultaneous determination of Cd and Fe in grain products using direct solid sampling and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 78, n. 2, p. 577-583, Apr 30, (2009).

- [118] RELLO, L.*et al.* A dried urine spot test to simultaneously monitor Mo and Ti levels using solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 81, p. 11-19, (2013).
- [119] MARTINS, C. A.*et al.* Metal Determination in Tea, Wheat, and Wheat Flour Using Diluted Nitric Acid, High-Efficiency Nebulizer, and Axially Viewed ICP OES. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 7, p. 1652-1660, (2015).
- [120] CERNOHORSKY, T.*et al.* Elemental analysis of flour-based ready-oven foods by slurry sampling inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Food Chemistry*, v. 106, n. 3, p. 1246-1252, (2008).
- [121] NASCIMENTO, A. N.; NAOZUKA, J.; OLIVEIRA, P. V. In vitro evaluation of Cu and Fe bioavailability in cashew nuts by off-line coupled SEC-UV and SIMAAS. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 1, p. 58-63, (2010).

## APÊNDICE

**Tabela 16.** Concentrações de Ca, K, Mg, P, Cu, Fe, Mn e Zn nas amostras do candidato a MR farinha de milho nas massas estudadas, após procedimento de decomposição de amostras e análise por ICP OES (média ± desvio padrão, n = 3).

Massa (mg)	Concentração (mg kg <sup>-1</sup> )							
	Ca	K	Mg	P	Cu	Fe	Mn	Zn
100	18,1	1274	195,0	556	0,78	10,26	0,90	5,07
100	38,7	1156	176,2	506	0,39	5,53	0,98	5,35
100	17,8	1247	194,5	521	0,32	7,60	0,77	5,66
<b>Média</b>	<b>24,9</b>	<b>1225,8</b>	<b>188,6</b>	<b>527,7</b>	<b>0,5</b>	<b>7,8</b>	<b>0,9</b>	<b>5,4</b>
<b>SD</b>	<b>12,0</b>	<b>61,4</b>	<b>10,7</b>	<b>25,4</b>	<b>0,2</b>	<b>2,4</b>	<b>0,1</b>	<b>0,3</b>
200	31,0	1207	182,4	511	0,45	8,03	0,84	5,29
200	24,8	1250	189,0	532	0,51	7,96	0,86	5,47
200	24,7	1321	197,7	555	0,56	9,25	0,66	4,97
<b>Média</b>	<b>26,8</b>	<b>1259,6</b>	<b>189,7</b>	<b>532,3</b>	<b>0,5</b>	<b>8,4</b>	<b>0,8</b>	<b>5,2</b>
<b>SD</b>	<b>3,6</b>	<b>57,6</b>	<b>7,7</b>	<b>22,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,7</b>	<b>0,1</b>	<b>0,3</b>
300	28,4	1264	197,0	539	0,53	8,63	0,82	4,98
300	26,6	1225	191,1	521	0,53	7,71	0,84	5,48
300	24,9	1249	194,7	517	0,57	8,31	0,89	5,82
<b>Média</b>	<b>26,6</b>	<b>1246,2</b>	<b>194,3</b>	<b>525,6</b>	<b>0,5</b>	<b>8,2</b>	<b>0,8</b>	<b>5,4</b>
<b>SD</b>	<b>1,8</b>	<b>19,5</b>	<b>3,0</b>	<b>12,1</b>	<b>0,0</b>	<b>0,5</b>	<b>0,0</b>	<b>0,4</b>
400	28,3	1238	194,7	530	0,55	8,35	0,85	5,57
400	27,6	1231	189,7	517	0,53	8,02	0,82	5,45
400	27,6	1231	187,1	517	0,53	8,01	0,81	5,39
<b>Média</b>	<b>27,85</b>	<b>1233,70</b>	<b>190,53</b>	<b>521,18</b>	<b>0,54</b>	<b>8,13</b>	<b>0,83</b>	<b>5,47</b>
<b>SD</b>	<b>0,42</b>	<b>4,06</b>	<b>3,87</b>	<b>7,82</b>	<b>0,01</b>	<b>0,20</b>	<b>0,02</b>	<b>0,09</b>
500	27,2	1242	192,4	568	0,54	8,33	0,92	5,33
500	27,5	1252	196,7	540	0,54	7,73	0,85	5,59
500	26,6	1212	191,9	482	0,58	8,12	0,78	5,48
<b>Média</b>	<b>27,1</b>	<b>1235,4</b>	<b>193,7</b>	<b>530,1</b>	<b>0,6</b>	<b>8,1</b>	<b>0,9</b>	<b>5,5</b>
<b>SD</b>	<b>0,5</b>	<b>20,6</b>	<b>2,6</b>	<b>43,8</b>	<b>0,03</b>	<b>0,3</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>

**Tabela 17.** Concentrações de Ca, K, Mg, P, Cu, Fe, Mn e Zn nas amostras do candidato a MR farinha de milho do estudo de homogeneidade intra frascos, após procedimento de decomposição de amostras e análise por ICP OES (média  $\pm$  desvio padrão, n = 3).

Amostra	Concentração (mg kg <sup>-1</sup> )							
	Ca	K	Mg	P	Cu	Fe	Mn	Zn
3.1	26,423	1172,3	173,8	493,58	0,525	8,249	0,748	5,195
3.2	27,990	1247,4	183,8	486,22	0,545	8,078	0,790	5,419
3.3	28,379	1264,2	204,6	530,29	0,557	8,041	0,795	5,583
3.4	28,333	1250,4	197,2	533,51	0,566	8,100	0,812	6,191
3.5	28,320	1275,8	191,4	553,65	0,555	8,411	0,885	5,723
3.6	28,719	1258,0	186,7	550,21	0,540	8,088	0,819	5,714
3.7	28,526	1268,4	194,7	507,42	0,527	7,975	0,931	4,667
3.8	27,905	1234,8	199,0	535,36	0,543	8,780	0,817	4,997
3.9	28,673	1235,0	202,2	518,89	0,540	8,100	0,907	5,794
3.10	27,669	1253,7	195,1	531,00	0,564	8,177	0,841	6,126
3.11	27,718	1217,1	160,9	504,92	0,540	7,674	0,786	5,337
3.12	25,845	1176,7	170,0	501,95	0,522	7,382	0,829	5,179
3.13	28,259	1235,3	181,1	542,38	0,526	7,949	0,808	5,439
3.14	27,230	1235,0	180,5	518,48	0,532	8,447	0,871	5,554
3.15	26,088	1202,9	172,1	502,60	0,471	8,100	0,798	5,084
<b>Média</b>	<b>27,738</b>	<b>1235,14</b>	<b>186,20</b>	<b>520,70</b>	<b>0,537</b>	<b>8,103</b>	<b>0,829</b>	<b>5,467</b>
<b>SD</b>	<b>0,934</b>	<b>31,15</b>	<b>13,03</b>	<b>20,77</b>	<b>0,023</b>	<b>0,321</b>	<b>0,050</b>	<b>0,414</b>



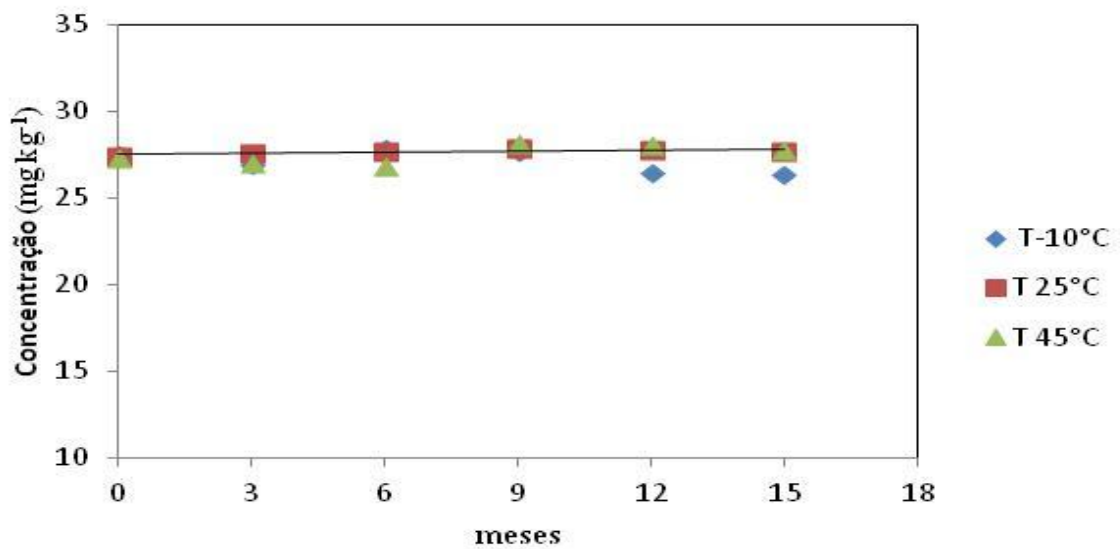
**Tabela 18.** Concentrações de Ca, K, Mg, P, Cu, Fe, Mn e Zn nas amostras do candidato a MR farinha de milho do estudo de homogeneidade inter frascos, após procedimento de decomposição de amostras e análise por ICP OES (média  $\pm$  desvio padrão, n = 3).

Amostra	Concentração em (mg kg <sup>-1</sup> )							
	Ca	K	Mg	P	Cu	Fe	Mn	Zn
64.1	26,4	1213	187,586	512,999	0,588	8,03	0,863	5,417
64.2	28,3	1255	191,160	523,068	0,576	7,98	0,840	5,830
64.3	31,7	1237	193,800	529,941	0,574	7,98	0,858	5,649
93.1	27,9	1178	194,411	518,973	0,557	8,70	0,838	5,399
93.2	29,7	1298	168,084	522,930	0,578	9,18	0,879	5,823
93.3	28,3	1259	190,655	516,562	0,573	9,14	0,852	5,514
10.1	26,7	1219	196,102	536,835	0,599	8,01	0,877	5,592
10.2	23,8	1083	161,858	451,737	0,454	6,86	0,728	4,754
10.3	27,2	1215	187,261	524,602	0,566	7,68	0,813	5,380
40.1	28,7	1247	183,543	530,874	0,426	8,10	0,836	5,769
40.2	26,7	1294	194,510	542,270	0,556	8,08	0,820	5,936
40.3	25,2	1286	191,718	523,302	0,509	7,75	0,807	5,462
85.1	26,7	1279	214,714	511,114	0,600	7,92	0,845	5,849
85.2	30,5	1248	196,244	557,842	0,775	7,90	0,801	5,559
85.3	25,1	1214	187,493	523,261	0,541	7,53	0,855	5,380
92.1	27,4	1249	195,042	512,479	0,541	8,07	0,858	5,842
92.2	29,5	1265	198,471	559,207	0,525	8,04	0,841	5,529
92.3	25,2	1207	188,871	517,979	0,550	8,91	0,838	5,264
16.1	27,4	1284	186,142	497,550	0,540	7,68	0,848	5,529
16.2	27,2	1223	176,194	538,075	0,506	7,78	0,856	5,673
16.3	28,3	1284	213,912	553,545	0,549	8,05	0,806	5,887
86.1	28,2	1273	185,268	557,983	0,540	7,97	0,811	5,558
86.2	27,1	1208	190,842	505,745	0,554	8,86	0,788	5,341
86.3	26,3	1187	180,926	487,229	0,486	7,44	0,796	5,166
66.1	25,9	1155	193,783	476,541	0,489	8,40	0,810	5,172
66.2	26,9	1160	174,020	485,152	0,547	7,60	0,798	5,280
66.3	29,0	1285	183,385	530,487	0,539	8,19	0,853	5,639
<b>Média</b>	<b>27,5</b>	<b>1233</b>	<b>189,111</b>	<b>520,307</b>	<b>0,550</b>	<b>8,07</b>	<b>0,830</b>	<b>5,526</b>
<b>SD</b>	<b>1,74</b>	<b>50,7</b>	<b>11,356</b>	<b>25,400</b>	<b>0,061</b>	<b>0,526</b>	<b>0,033</b>	<b>0,269</b>

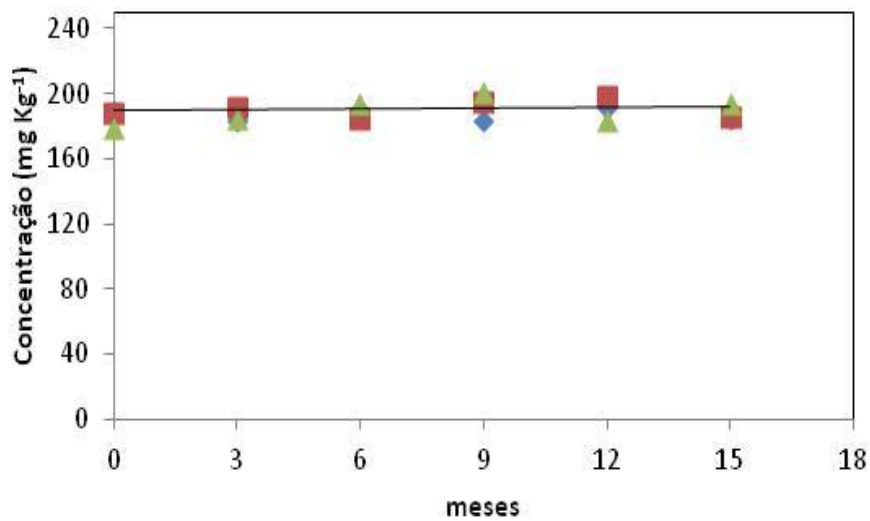
## APÊNDICE

**Figura 12.** Curvas de regressão para teste de estabilidade do candidato a material de referência. A) Ca, B) K, C) Mg, D) P, E) Cu, F) Fe, G) Mn, H) Zn.

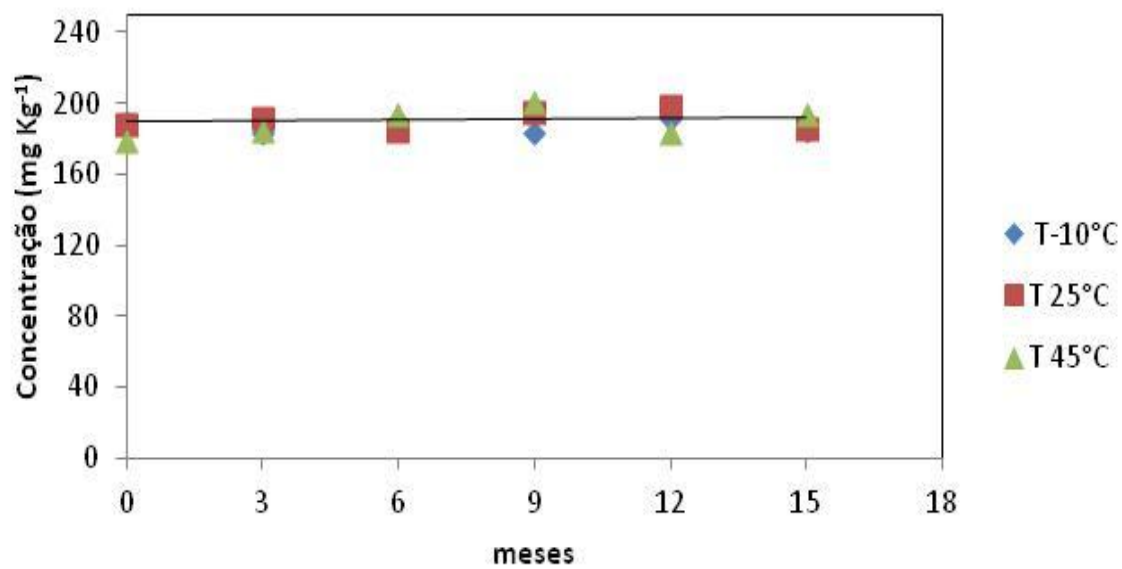
### A) Ca



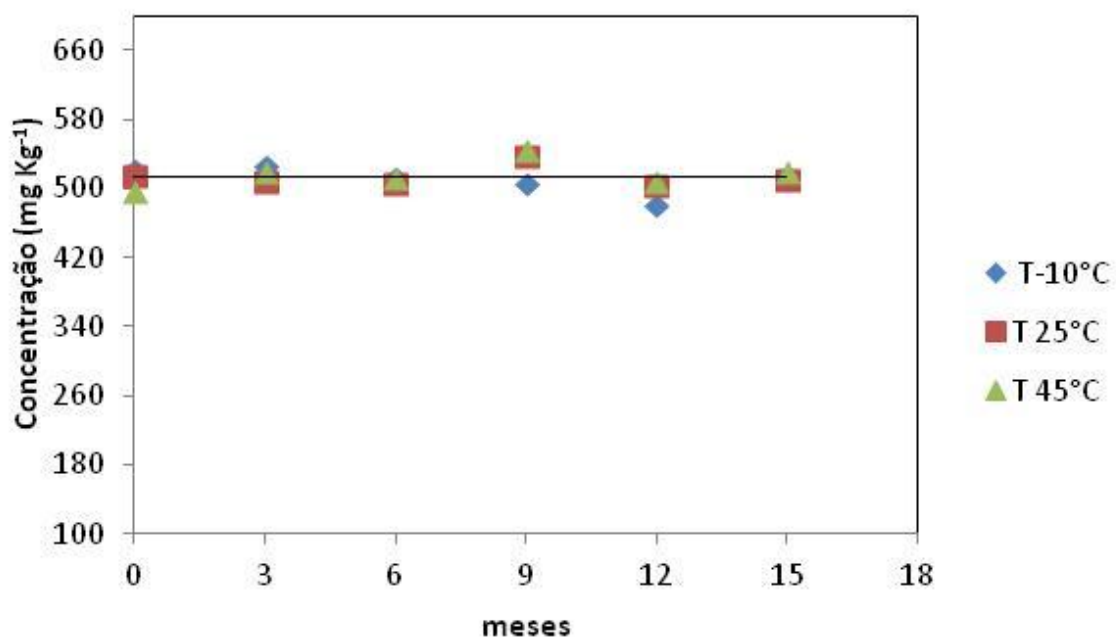
### B) K



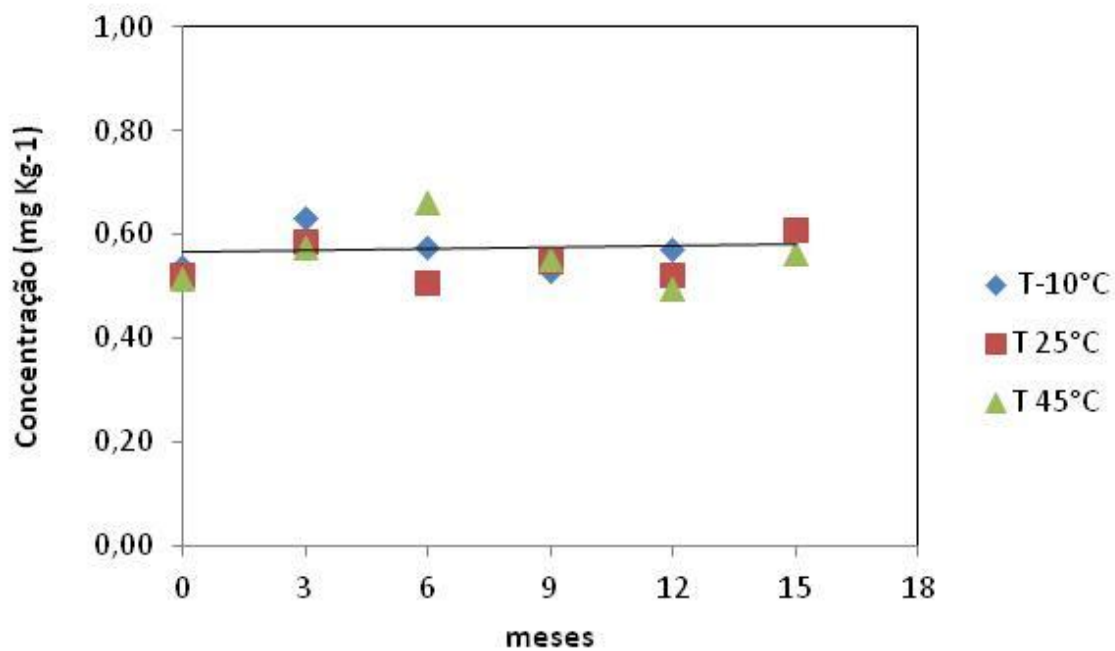
### C) Mg



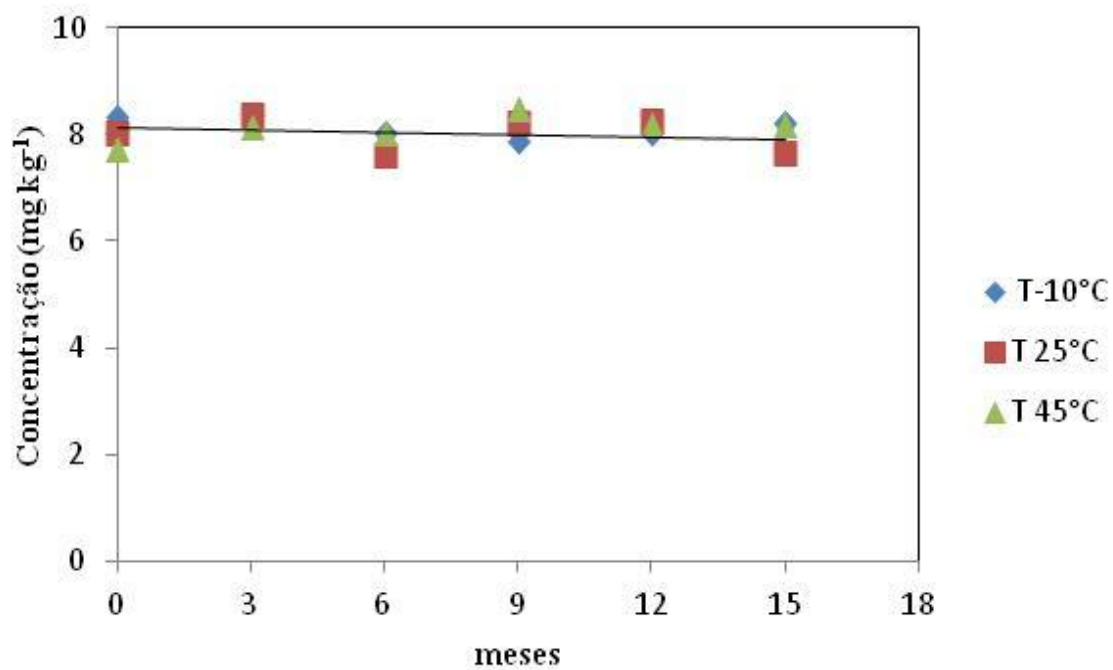
### D) P



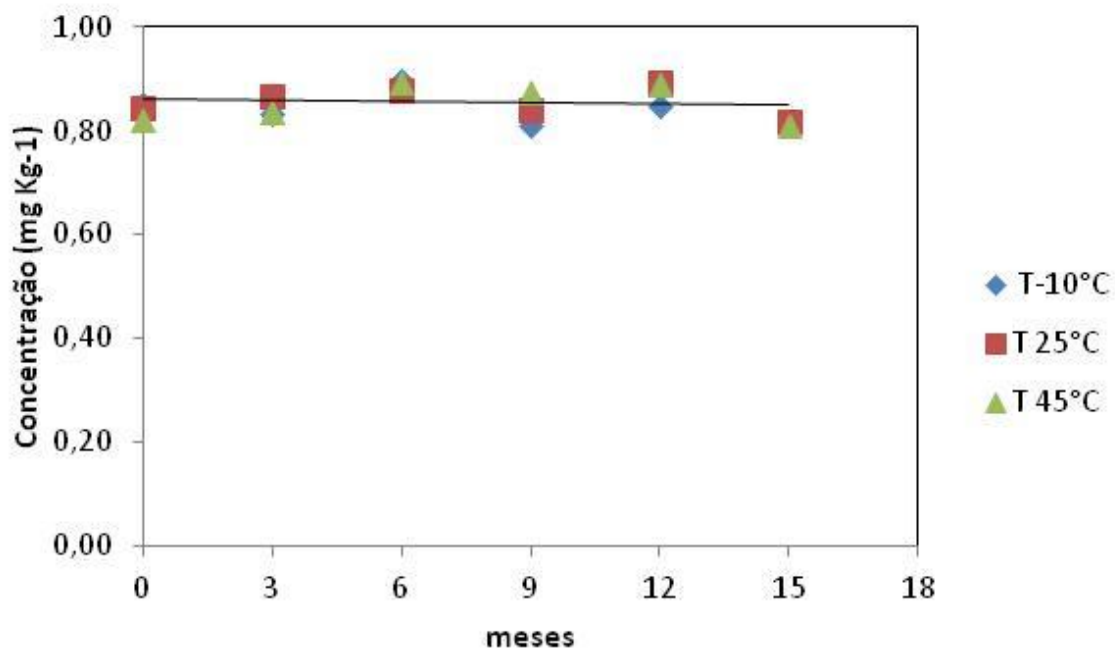
### E) Cu



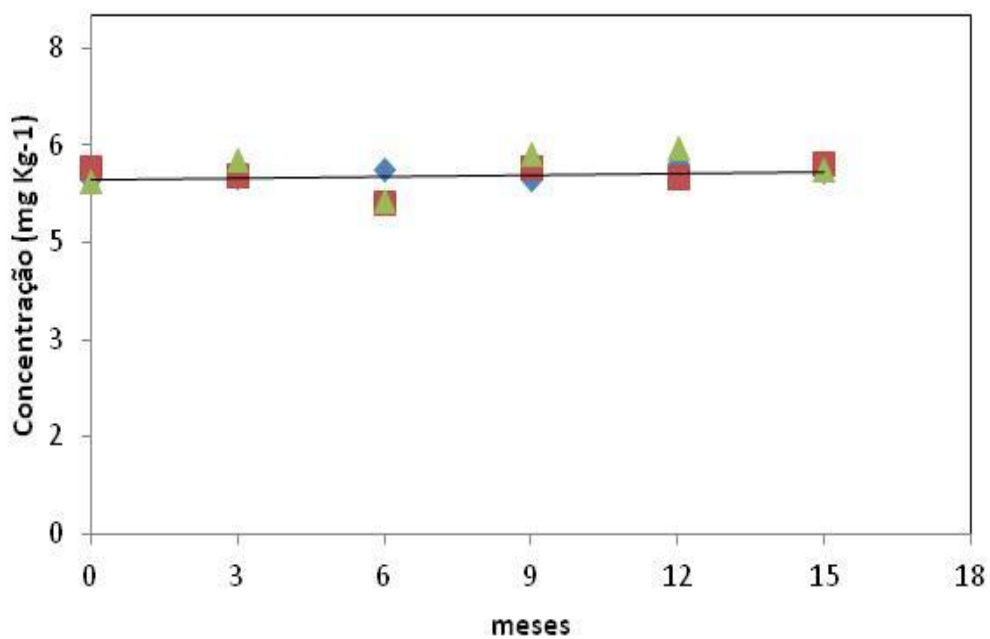
### F) Fe



### G) Mn



### H) Zn



**Tabela 19.** Resultados fornecidos pelos laboratórios colaboradores.

Laboratório	Concentração (mg kg <sup>-1</sup> )								
	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	P	Zn	Mo
Lab 1.1	26,00	0,49	8,40	1155	193,8	0,81	476,5	5,17	0,05
Lab 1.2	26,99	0,55	7,60	1161	174,0	0,80	485,2	5,28	0,06
Lab 2.1			7,72			0,47			
Lab 2.2			10,60			0,61			
Lab 3.1	32,00	0,63		1280	194,0	0,86		4,58	
Lab 3.2	30,00	0,52		1160	165,0	0,78		3,66	
Lab 4.1	15,60	0,23	4,30	856	171,0	0,78	580,0	4,10	
Lab 4.2	17,00	0,14	3,80	876	170,0	0,76	587,0	4,30	
Lab 5.1	33,38	0,47	7,79	1440	155,8	1,00	862,5	7,46	2,17
Lab 5.2	45,87	0,54	12,37	1655	184,8	1,13	1135,7	8,99	2,41
Lab 6.1			4,82	1218	272,0	2,43		9,24	
Lab 6.2			5,24	1239	275,0	0,74		8,75	
Lab 7.1	19,30	0,68	8,06	1498	193,5	0,83	550,5	5,90	
Lab 7.2	23,20	0,66	8,17	1343	191,3	0,82	551,4	5,70	
Lab 8.1	21,43	0,61	3,94	1300	186,9	1,04		4,06	
Lab 8.2	23,85	0,67	4,04	1328	190,9	1,07		4,27	
Lab 9.1	18,82	0,64	3,68	1282	186,0	1,05		3,98	
Lab 9.2	23,21	0,67	4,68	1293	184,5	1,04		4,18	
Lab 10.1		4,45	185,58		177,9	3,10		5,43	
Lab 10.2		4,57	179,12		173,8	3,44		5,74	
Lab 11.1		2,78	5,53	7425		6,11	539,0	4,40	
Lab 11.2		2,65	5,15	7082		6,49	500,0	5,21	
Lab 12.1	25,07	0,59	7,10	1150	181,0	0,92	470,9	5,22	0,08
Lab 12.2	26,22	0,53	7,40	1166	182,1	0,80	480,0	5,32	0,08
Lab 13.1	23,25	0,66	4,89	1881	205,9	0,99	593,0	5,94	0,05
Lab 13.2	25,59	0,78	3,48	1865	194,8	0,87	512,9	6,24	0,05

## APÊNDICE

Laboratórios que participaram da caracterização interlaboratorial:

GRPQQ da Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Grupo de Pesquisa em Química e Quimiometria, Campus Ondina, CEP 41170-115, Salvador, Ba, Brasil. Colaboradores: Sérgio L. C. Ferreira e Fernanda A. de Santana

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Laboratório de Química Analítica (LQA 1), Campus de Jequié, CEP 45206-190, Jequié, Ba, Brasil - Colaboradores: Valfredo Azevedo Lemos e Marcio José

Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia. Campus A. C. Simões, CEP 57072900, Maceió, Al, Brasil.- Colaboradora: Daniela S. Anunciação

University of the Balearic Islands. Laboratory of Environmental Analytical Chemistry. Dep. Chemistry. Carretera de Valldemossa, km 7'5 07122 Palma de Mallorca. Espanha. Colaboradores: Edwin Palacio, Laura Ferrer

University of the Balearic Islands. Laboratory of Environmental Analytical Chemistry. Dep. Chemistry. Carretera de Valldemossa, km 7'5 07122 Palma de Mallorca. Espanha. Colaboradores: Lindomar A. Portugal e Victor Cerdá

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Laboratório de Química Analítica (LQA 2), Campus de Jequié, CEP 45206-190, Jequié, Ba, Brasil- Colaboradores: Marcos A. Bezerra e Gisseli Valasques

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN - CNEN/SP, Centro do Reator de Pesquisa, CRPq, Laboratório de Ativação Neutrônica, CEP 05508-000 - São Paulo – SP, Brasil.- Colaboradores: Edson G. Moreira e Regina Beck Ticianelli

Universidade Federal da Bahia, Instituto de Geociências, Núcleo de Estudos Ambientais. Campus Ondina, CEP 40170110 - Salvador, Ba, Brasil- Colaborador: Rui J. L. Garcia

Universidade Estadual de Santa Cruz, Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas. Campus Soane Nazaré de Andrade, CEP 45662900 - Ilhéus, Ba – Brasil – Colaborador: Daniel C. Lima

Universidade Federal de Ouro Preto, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Departamento de Química, CEP 35400000 - Ouro Preto, MG – Brasil – Colaboradora: Roberta Eliane S. Froes

SENAI- Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial, Av. Luiz Tarquínio Pontes, 938 – Aracuí. 42700-000 - Lauro de Freitas – BA. Colaboradoras: Adriana C. Ferreira e Marina C. Rodrigues

IDEIA- Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Campus Ondina, CEP 41170-115, Salvador, Ba, Brasil. Colaborador: Jorge Santos de Almeida

Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Campus Ondina, CEP 41170-115, Salvador, Ba, Brasil. Colaborador: Jucelino B. Júnior

Laboratório de Química Analítica Ambiental – LQA. Departamento de Química – DQI. Universidade Federal de Sergipe – UFS. Instituto Tecnológico e de Pesquisas do Estado de Sergipe – ITPS. Colaboradores: - Rennan Geovanny Oliveira Araujo, Silvânio Silvério Lopes da Costa, Mayra Sandrine dos Santos, Carlos Alexandre Borges Garcia e José do Patrocínio Hora Alves